

발 간 등 록 번 호

11-1543000-002419-01

# 야관문을 이용한 혈관이완 개선 건강기능 식품개발 사업화 최종보고서

---

2018. 12. 12.

주관연구기관 / (주)네추럴웨이  
협동연구기관 / 단국대학교병원  
중앙대학교

기술사업화지원사업 R&D Report

농림축산식품부

<제출문>

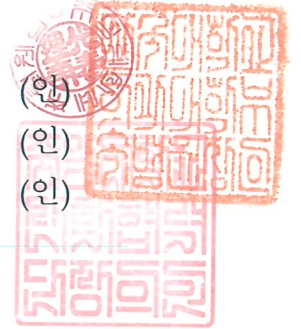
## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “야관문을 이용한 혈관이완 개선 건강기능 식품개발 사업화”(개발기간 : 2016. 08. 25 ~ 2018. 08. 24)과제의 최종보고서로 제출합니다.

20 18. 10. 08.

주관연구기관명 : (주)네추럴웨이 (대표자) 최종현 (인)  
협동연구기관명 : 단국대학교병원 (대표자) 장충식 (인)  
협동연구기관명 : 중앙대학교 (대표자) 김원용 (인)



주관연구책임자 : 유상우  
협동연구책임자 : 이성  
협동연구책임자 : 이상현

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....  
2. 연구수행 내용 및 결과 .....  
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....  
4. 연구결과의 활용 계획 등 .....  
붙임. 참고 문헌 .....

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발 목적

: 개별인정형 남성갱년기 혈관이완 제품 런칭 및 판매

## 1-2. 연구개발의 필요성

- 남성 갱년기 증상 중 가장 대표적인 신체 증상은 성욕감퇴 및 발기부전임을 확인할 수 있다. 또한 발기부전은 성생활에 충분한 발기가 되지 않거나 유지되지 않은 상태를 의미한다. 일반적으로 이러한 상태가 3개월 이상 지속되었을 경우 발기부전으로 정의한다.

〈그림. 발기부전의 원인〉

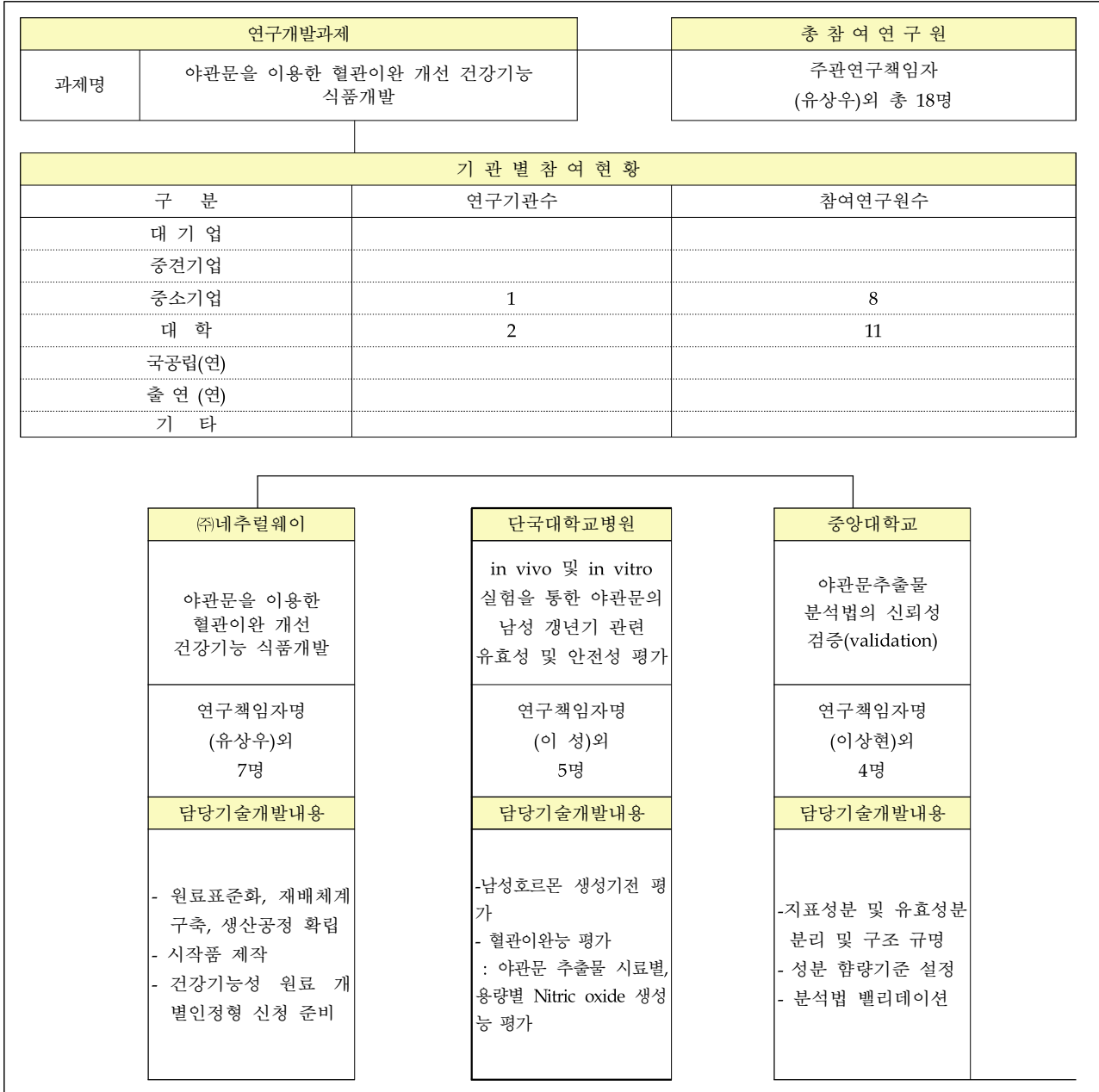


본 연구의 주 원료인 야관문(*Lespedeza Cuneata*)은 콩과의 여러 해살이 식물로 비수리, 삼엽초 등의 여러 가지 이름으로 불리며, 우리나라와 일본, 중국, 대만 등지에 분포하고 있다. 황폐지의 지피물 조성과 지력증진 식물로 널리 이용되는 혼한 식물이지만 예로부터 민간에서는 음위증이나 유정, 기침, 천식 등의 치료에 효능이 약재로 쓰여 왔으며, 야관문의 생리활성 물질로 pinitol, flavonoid, phenol성분, tannin 및  $\beta$ -sitosterol을 함유하며, flavonoid 중에서도 quercetin, kaempferol, vitexin, orientin 등이 분리되어 있음이 보고되었다. 야관문의 생리활성에 대한 연구로는 동물실험을 통한 혈당 강하 효과와 포도당 독성에 대한 세포보호 효과가 보고되었다.

특히, 야관문이 산화질소-cGMP계를 통한 내피세포 의존성 혈관이완작용이 있고, 야관문 메탄올 추출물의 n-hexane층이 토끼의 음경해면체 평활근에 대한 이완효과가 있는 것으로 보고되어 심혈관 질환과 발

기부전의 치료에 활용할 수 있는 약물로 알려져 있다.

1-3. 연구개발 추진체계



1-4 추진일정

1차년도															
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	원료표준화	[Shaded]												40,000	유상우(네추럴웨이)
2	재배체계 구축	[Shaded]												60,000	
3	생산공정 확립	[Shaded]												10,000	
4	활성 시험	[Shaded]												40,000	이성(단국대병원)
5	성분분리 및 구조 규명	[Shaded]												30,000	이상현(중앙대)
6	지표성분 정량 분석법 개발	[Shaded]												30,000	

(2)차년도															
일련 번호	연구내용	추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
1	시작품제작	[Shaded]												60,000	유상우(네추럴웨이)
2	건강기능성 원료 개별인정 신청 준비	[Shaded]												50,000	
3	활성 시험	[Shaded]												100,000	이성(단국대병원)
4	안전성평가	[Shaded]													
5	유효성평가	[Shaded]													
7	성분 함량기준 설정	[Shaded]												40,000	이상현(중앙대학교)
8	분석법 밸리데이션	[Shaded]												40,000	

## 2. 연구수행 내용 및 결과

### ○ 연차별 개발목표 및 내용

#### 가. 1차년도

##### ① 개발 목표

- 주관연구기관((주)네추럴웨이) : 원료표준화, 재배체계구축, 생산공정확립
- 협동연구기관(단국대학교병원) : in vivo 및 in vitro 실험을 통한 야관문의 남성 갱년기 관련 유효성 및 안전성 평가, 유사제품 비교분석, 용량설정, 호르몬과 상호작용 규명
- 참여기관(중앙대) : 지표성분 및 유효성분 분리 및 구조 규명

##### ② 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

- 주관연구기관((주)네추럴웨이) :

#### 1. 원료의 표준화를 위한 최적화 산지 구축 process



## 2. 기초자료 수집 및 분석

### 2-1. 기초자료 수집 및 목록작성

#### ○기초자료 수집

- 임상도(1:5,000)
- 산림입지도(1:25,000)
- 산림입지도토양도(1:5,000)
- 수치지형도(1:5,000)
- 수치지질도(1:50,000)
- 항공사진, 기상자료, 국유림

### 2-2. 기초자료 분석

- 권역별 대상지 산림입지도(1:25,000) 및 산림입지도토양도(1:5,000)자료 분석
- 산림입지도 주요 토양인자 분석
- 수치지형도 표고/경사/방위 기초정보 취득

- 임상도(1:5,000)를 활용하여 임분 확인
- 수치지질도 모암 속성 취득
- 산림정보 다드림 시스템 활용

〈표 1〉 기초통계량

구 분	조직형태(개소)		조직규모(개소)		지역별(개소)*	
	농 협	32	대 형	28	경 기	7
조사대상 산지유통조직 (91개소)	조공법인	31	중 상	13	강 원	5
	영농법인	28	중 하	50	충 북	6
	평균 참여농가수(명)		평균 매출액(백만원)		충 남	5
	평 균	1,624	평 균	25,961	전 북	9
	평균 공동계산율(%)		농가당 평균소득(백만원)		전 남	11
	평 균	53.5	평 균	175	경 북	24
					경 남	23

\* 제주지역은 1개소로 지역별 분석에서 제외함.

### 2-3. 입지환경조사

○GPS좌표, 표고, 경사, 방위, 모암, 기후대지형, 사면위치, 경사형태, 퇴적식, 풍노출도 배수상태, 침식상태, 암석노출도 조사 실시

### 2-4. 토양단면조사

- 낙엽층두께, 유효토심, 토심 토색, 풍화정도, 토성, 토양구조, 건습도, 석력함량, 견밀도
- 산림토양조사메뉴얼을 준수하여 조사 실시
- 토색 판정 시 반복적으로 토색칩 확인
- 토양단면사진 및 주임분 배경 근경사진 촬영

### 2-5. 시료 채취 및 분석

- 시료 채취
  - A층(표토), B층(심토), 0~10cm, 0~30cm
- 시료분석
  - 토성, pH, EC, 유기물, 전질소, 유효인산, CEC, 치환성양이온(K, Ca, Mg, Na), 염분





인제



2-6. 자료 정리

- 실내, 현지조사 자료 정리 및 시료 분석 결과 확인
- 기초자료, 자료분석, 현지조사 들 자료정리 및 분석

2-7. 문제점 협의 및 결과분석

- 자료정리를 통해 발견된 문제점 협의 및 결과분석

2-8. 최적지 선정

- 야관문 재배자와 토양전문가 등 산지유통조직 최적지 선정에 대한 의견 수렴
- 재배자와 전문가 등 의견수렴 결과를 통한 야관문(비수리) 최적지 선정

재배체계구축

야관문 재배방법

1. 야관문은 씨앗으로 번식하며 파종시기는 대개 3월중순에서 4월중순 사이가 좋다.
2. 밑거름을 300평당 유기질 비료 5~6포 정도 뿌리고 로타리 친 후 넓이 100~120cm 두둑을 만든 후 그 위에 사방 20cm 간격으로 구멍이 뚫린 검은 비닐을 깔고 파종을 하면 풀매기를 줄일 수 있어 관리에 용이하며 배수가 잘 되는 땅이면 전국 어디서나 재배할 수 있다.
3. 경작관리는 묘목의 높이가 3~4cm 되었을 때 묘목을 똑같이 솟아내어 구멍 하나에 4~5포기씩 남기고 동시에 김매기하고 웃거름을 한번 준다.
4. 그후 6~8월 및 10월에 수확하고 다시 사이갈이와 김매기를 각각 한번씩 하고 6월과 10월에 김매기를 한 후에는 웃거름을 한번씩 준다.
5. 이듬해부터 해마다 4, 6, 10월에 한번씩 사이갈이와 김매기를 하고 웃거름을 해야 한다.

원료표준화

1. 산지선정: 남한 4지점에서 채집한 야관문의 기능, 지표성분 함량을 체크한다.
2. 채집시기: 6~10월 매달 채집하여 야관문의 기능, 지표성분 함량을 체크한다.
3. 종자감정: 외래 자문을 통해 배기환교수님께 자문을 구하고 시료를 보관한다.

### 생산공정확립

#### 1. 추출공정확립

- 기존 물추출공정은 이미 확립 되었음
- 핵산추출후 활성 비교분석을 통해 핵산층 생산공정 추가 여부 결정



**원물 세척**

✓ 농수산물 원물 세척



**원물 파쇄**

✓ 대용량 파쇄기



**추출포 침지**

✓ 원물을 담은 추출포 용매침지



**추출**

✓ 100°C 24시간 원물대비 상수10배



**농축**

✓ 4.5T 감압농축기



**분무 건조**

✓ 100kg 분무건조기  
(Fluid bed granulator)



**포장**

✓ 내포장 파손에 대비한 포장방법



**품질관리**

✓ 엄격한 품질관리  
✓ 기준규격 검사

- (1) 원료는 법적규격 및 자체규격에 적합한 것만을 사용한다.
- (2) 제품 제조 기계 및 기구는 작업전에 위생적으로 살균 및 소독한다.
- (3) 원료배하비율대로 원료를 칭량한다.
- (4) 원료에 10배수의 정수를 넣어 추출한다.
- (5) 여과후에 여액을 농축기로 이송하여 농축한다.
- (6) 용해 : 농축액을 원액탱크에 순서별로투입하고 텍스트린을 첨가하여 용해한다.
- (7) 살균 : 용해액을 원액탱크안에서 살균한다.
- (8) 분무건조 : 용해액을 분무건조기를 이용하여 건조시킨다.

#### 2. 제형별 공정확립

- 1) 정제타입
- 2) 음료: 비수리 추출액 원액을 확보
- 3) 과립: 비수리에 텍스트린을 20%첨가하여 유동성 과립 생산
- 4) 연질, 경질캡셀: 유동성 과립을 캡셀 기체에 충전 후 가공적성 검토

- 1 협동연구기관(단국대학교병원) : 유사제품 비교분석 비아그라/민들레/마카 등  
in vivo (NO 발생량 분석)

1. 연구목적

갱년기란 성 호르몬 (sex hormone)의 감소로 여러 증상이 나타나는 기간을 의미한다. 갱년기는 주로 중년 여성에게 나타나는 것으로 알고 있지만 30대 후반부터 성호르몬 분비가 서서히 감소하는 남성에게도 갱년기 증상이 나타나게 된다. 테스토스테론 (Testosterone)은 주로 남성의 고환에서 생산되며 남성의 신체 건강·정신 상태 등을 조절하고 남성다움과 성생활에 주도적인 역할을 한다. 30대 전후부터 해마다 약 1%씩 감소하여 50~70대 남성의 약 30~50%에서 남성호르몬이 정상치보다 감소되어 있다. 하지만 남성의 경우 여성과는 달리 생식 능력이 떨어지기는 하지만 완전히 소멸되는 것은 아니기 때문에 생식 능력의 소실을 의미하는 것은 아니며 갱년기 증상에 있어 개인차가 크게 난다.

Lespedeza Cuneata 는 콩과 싸리속에 속하는 여러 해살이 식물로 우리나라 이름으로는 비수리라고 불리운다. 남성의 갱년기의 혈액 순환에 도움을 주어 남성 호르몬의 변화를 보고자하여 실험 동물모델을 이용 함으로 독성평가 및 남성 호르몬 혈관기능 평가를 함으로 남성 갱년기 개선의 대체 약물로서의 가능성을 확인하고자 한다.

2. 실험방법

각각 대조군과 실험군으로 나누어 총 10군으로 한다. 4주 동안 주 3회 Lespedeza Cuneata 추출물을 존대를 이용하여 구강투여하고 체중을 측정한다. 4주 후 실험 종료한다.

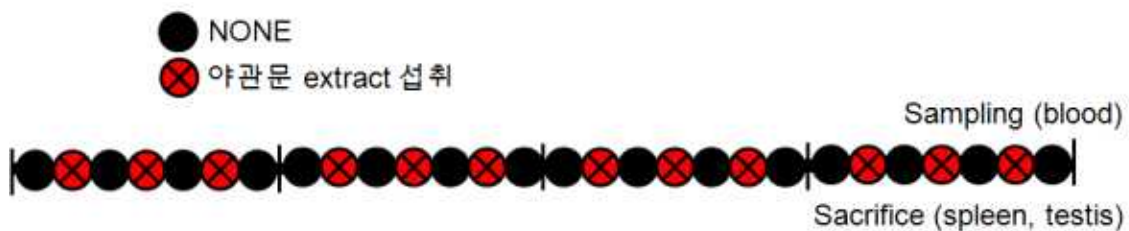
1) 샘플 설정

- ① 시기별 3종
- ② 지역별 2종
- ③ 양성대조군: 마카, 비아그라, 민들레추출물 3종
- ④ 음성대조군
- ⑤ 총 10군 (음성대조군 1, 양성대조군 3, 샘플 6)

2) 평가방법

4주 후 실험이 끝나면 마취 후 혈액 채취 후 동물들을 CO<sub>2</sub> 가스로 안락사 시키고, 비장과 고환을 적출한다. 비장은 무게 측정 및 표면과 상태 등의 육안 평가를 한다. 고환은 한쪽은 동결하고 다른 한쪽은 포르말린에 고정한다.

- ① 동물모델 : 8주령 웅성 SD rat, 군당 5마리씩 총 50마리
- ② 야관문 섭취기간 (4주)



- ③ 기간 중 일주일에 두 번씩 체중 측정
  - ④ 5 주차 : 마취 후 혈청 채집, Sacrifice 후 비장, 고환 추출
    - 추출한 비장은 무게 측정 및 표면, 상태 등의 육안 평가
    - 추출한 고환 한쪽은 동결, 한쪽은 포르말린에 담가 탈수 및 매염과정을 거쳐 면역 염색 준비
    - 혈액 생화학 분석(유효성 평가)
- 혈청으로는 GOT, GPT, BUN, 테스토스테론 측정

- 조직학적 분석

고환은 포르말린용액에 고정한 후, 고환 절편을 취하여 탈수시킨 후 파라핀 블록에 포매한다. 조직은 조직 절편기를 이용하여 5 $\mu$ m로 절단한 다음으로 코팅된 슬라이드에 붙여 파라핀 제거 및 염색과정을 거친 후 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색을 실시한다.

3. 유효성 평가

1) in-vitro

- 남성호르몬 생성기전 평가

: 야관문추출물의 17 $\beta$  HSD, 3 $\beta$  HSD 작용 확인을 통한 기전 규명

- 혈관이완능 평가

: 야관문 추출물 시료별, 용량별 Nitric oxide 생성능 평가

- 통계적 분석을 통한 유효성평가의 유의수준은 대조군 대비  $p < 0.01$  이하로 함.

2) in vivo

가) 성기능 평가

① 총테스토스테론 : 혈액검사 (ELISA)

② 17- $\beta$  HSD : 남성호르몬 생성기전, 혈액검사 (ELISA)

③ SHBG (Sexual hormone binding globulin) : 혈액검사 (ELISA)

나) 혈관기능 평가

① NO : 혈청샘플, ELISA, NO 측정 kit

② cGMP : 혈청샘플, ELISA

③ Prostaglandin (PGE) : 혈청샘플, ELISA

④ nNOS : 혈청샘플, ELISA

다) 지질대사기능 평가

① Total cholesterol, LDL-C, HDL-C 및 triglyceride : 혈청샘플, ELISA, 관련 측정 kit

라) 기타 기능 평가

① 혈당, 인슐린 : 혈청샘플, ELISA

- 통계적 분석을 통한 유효성평가의 유의수준은 대조군 대비  $p < 0.05$  이하로 함.

4. 안전성 평가

1) in-vitro

- 세포독성 시험

: 정상혈관 내피세포(Normal vessel endothelial cell)을 이용한 야관문 추출물의 시료별, 용량별 세포독성 평가 (MTT) 수행

2) in vivo

- 동물모델을 이용한 시료별, 용량별 야관문 추출물의 섭취에 따른 간독성검사(AST, ALT), 신장독성검사(BUN), 비장 등의 장기 무게의 변화 및 체중변화를 통한 안전성 평가 수행

- 호르몬 과잉 부작용 지표 평가

: 남성호르몬의 과잉 등의 영향으로 전립선비대 혹은 전립선암에 영향을 미치는지 야관문 추출물의 섭취 후 전립선 조직검사 및 적혈구과다증(Hemoglobin, RBC count) 부작용 평가

- 2협동연구기관(중앙대) : 분석법의 신뢰성 검증(validation)

○ 성분 분리 및 구조 규명

- 선정된 소재를 핸드 믹서로 곱게 마쇄한 후에 조말을 g당 5배 부피의 70% ethanol로 24시간 동안 흔들어 추출한 후 filtering 시킴. 이 과정을 5회 반복하여 추출한 후 감압 농축하여 시료 ethanol 추출물을 조제함.
- 극성에 따라 분획하여 분획물 확보..
- TLC와 각종의 수지를 사용하여 예비분리조건을 검토한 후 open column chromatography, TLC, prep-HPLC, analytical-HPLC 등을 사용하여 구조분석이 가능한 수준까지 정제함.
- 활성을 나타내는 분획물에 대하여, silica gel, C18, Sephadex LH-20 등의 resin을 이용한 open column chromatography, preparative TLC, semi-preparative HPLC 등의 방법을 활용하며 성분을 순수하게 분리 및 정제함.
- 분리된 화합물의 구조를 1D-, 2D-NMR 및 MS 등의 분광학적 방법으로 결정함.

○ 지표성분 정량분석법 개발

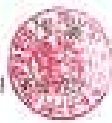
- 지표물질 선정: 추출물의 활성 지표물질을 선정하기 위해 추출 및 정제를 시행한 후, 분리된 활성물질의 순도를 높이기 위해 HPLC를 통해 분석함. 성분 peak들 중에서 분석법 설정과 정제분리의 용이성을 고려하여 지표물질로 선정함.
- 품질 관리를 위하여 HPLC 이용하여 기준 및 시험법을 설정하고 지표성분 함량기준을 설정하고자 함.
- 이동상 및 고정상의 최적화

## 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명 최 종 현		
발업소	명칭(상호) (주)비추일웨이		
	소재지 경기도 포천시 설운동 해룡로 83-135		
제품정보	식품의 유형	기타기능물	영양신고 번호
	제품명	비수리추출분말	
	유통기한 품질유지기한	제조일부처 0년 제조일부처 2년	
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	별첨	
	용도 용법	별첨	
	고급방법 및 포장재질	별첨	
	포장방법 및 포장단위	별첨	
	상상	별첨	
	고열탕·저열탕 식품 해당 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 해당 없음	

기타	
----	--

「식품위생법」 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 보고서를  
고합니다.

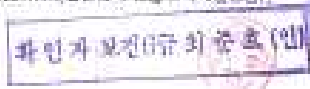
2015. 08. 10  
보고인  
최종현 (서명)  


**특별자치도지사 · 시장 · 군수 · 구청장 귀하**

첨부서류	1. 제조방법설명서 1부 2. 식품위생법시기관이 발급한 제품들의 원시제 기준 및 규격 검출서 1부 3. 식품첨가물안전성평가 정하여 고시한 방법에 따라 별첨한 유통기한의 설정서류서 1부
------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------

(유위사항)

1. 품목제조보고서는 제품생산의 개시 전이나 개시 후 2일 이내에 제출하여야 합니다.
2. 배합비율 표시는 식품공전 및 식품첨가물공전에 사용기준이 정하여져 있는 원재료 또는 성분의 경우만 해당합니다.

210mmx297mm(일반용지 80g/m<sup>2</sup> (재활용종))  


## 제조방법설명서

제품명	스프롬 V
원료 및 성분함량	<내용물비율:100%>1<기능성원료:4,6813%>비타민 A 혼합(0.15%)[레티닐 아세트산염(11.5%,비타민A - 99%),비타민 E(0.15%,비타민E - 99%),말토덱스트린(47%),옥수수 전분(30%),아라비아검(2%)],비타민 B1염산염(0.0422%)비타민B1 - 78%),비타민 B2(0.0425%,비타민B2 - 86%),니코틴산아미드(0.3%),니코틴산,니코틴산아미드 - 99%),비타민 C(2.0235,비타민C - 99%),비타민 D3 혼합제제(0.03%) [아라비아검(3%),설탕(3%),옥수수 전분(15.35%),중과중성지방(7.5%),이산화규소(0.5%),비타민 D3(0.23%,비타민D - 99%),비타민 E(0.2%,비타민E - 99%)],비타민 E 혼합(2%) [DL-α-토코페릴 아세테이트(50%,비타민E - 99%),말토덱스트린(24.5%),면성전분(24.5%),이산화규소(1%)],비타민 B6 염산염(0.0472%,비타민B6 - 80%),4-비타민(16.3857%)스테아린산아미드(1%) (9.6%),김장김합품오스(26.0667%),히드록시프로필셀룰로오스(2%),카르복시메틸셀룰로오스(2%),리베아 발효추출물(1.25%) [유산균발효액(전조물(파로마실러스사케이)배양전조물)(35%),덱스트린(45%)],비수리(어린 잎)추출물(추출액)분말(분말 추출물)(62.5%) [비수리(어린 잎)추출물(추출액)분말(분말 추출물)(80%),덱스트린(20%)],오라드라이 (121H190002)(1%) [히드록시프로필셀룰로오스(90.091%),글리세린(9.909%)]
섭취방법	1일 1회, 1회 2정(1600mg)을 물과함께 섭취하십시오.
섭취 시 주의사항	1. 섭취량 및 섭취방법을 확인한 후 섭취하여 주십시오. 2. 임신부 및 수유부는 섭취 전 의사와 상담하시고, 특정 원료에 알레르기를 나타내는 경우 이는 섭취에 주의하십시오. 3. 섭취 전에 유통기한을 확인한 후 섭취하여 주십시오.
포장방법	PTP포장,PE넵포장,PET넵포장
포장단위	800mg X 4, 8, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 30, 32, 40, 55, 60, 84, 90, 112, 120, 150, 180, 224, 240, 300또는 360정
포장재질	PTP포장(Polyvinylchloride, 알루미늄호일) PE넵포장(PE넵) PET넵포장(PET넵)
형상	이미,이러가 없고 고올의 향미가 있는 호런깡깡색의 타원형 코팅정제
기능성 내용	[비타민D]①권항조직 형성과 기능유지에 필요②혈액의 흡수에 필요③유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요 [비타민B6]①유해산소로부터 세포를 보호하는데 필요 [나이아신]①체내 에너지 생성에 필요 [비타민C]①어두운 곳에서 시각 적응을 위해 필요②피부와 탄력을 형성하고 기능을 유지하는데 필요 ③상대세포의 성장과 발달에 필요 [비타민E]①단백질 및 아미노산 이용에 필요②혈액의 호모시스테인 수준을 정상으로 유지하는데 필요 [비타민A]①안수화물과 에너지 대사에 필요 [비타민B1]①체내 에너지 생성에 필요 [비타민B2]①갑상선 안이 흡수되고 이용되는데 필요 ②백의 형성과 유지에 필요
제조방법	1) 원료 : 모든 원료를 원료규격에 맞는지 시험 후 적합 판정을 받은 원료를 사용한다. 2) 칭량 : 각각의 원료를 해합비에 얹게 전자저울을 이용하여 정확히 칭량한다. 3) 과립 및 건조 : 과립기를 이용하여 과립을 제조 후 건조기를 이용하여 건조한다. 4) 혼합 : 롤믹터를 넣은 후 혼합한다. 5) 다질 : 다질기를 이용하여 일정량을 다질한다. 6) 코팅 : 코팅기를 이용하여 일정량을 코팅한다. 7) 선별 : 상당한 정제후 선별한다. 8) 포장방법 : 선고된 포장재질에 적합한 포장방법 및 포장단위로 포장한다. 9) 검사 : 권장기능허용 규격에 따라 검사를 실시한다 10) 출고 : 포장상태에 이상 유무를 확인하여 규격에 적합한 제품에 선하여 출하한다.

# 검사성적서

발급번호 : R20141125-0007

접수번호 : 2014110010008-0001

검체명	스트롱V(STRONG V)	제조일자	2014-10-28	유형기하	
의뢰업체명	(주)네추럴웨이	성명	최종현		
의뢰업체주소	경기 포천시 해방로 83-135 (설운동)				
제조번호		접수년월일	2014-11-05		
장사의뢰목적	건강기능식품품질제조신고용	식품유형	건강기능식품(나이아신, 비타민A, 비타민B1, 비타민B2, 비타민B6, 비타민C, 비타민D, 비타민E)		

## 시험 항목 및 결과

시험항목	기준	결과	항목판정
중해시험	적합	적합	적합
나이아신(4.75mgNE/1600mg)	표시량의 80% ~ 150%	103%(4.89mgNE/1600mg)	적합
성상	고유의 색택과 향미를 가지며 이 미,이취가 없어야 함	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 흰색의 타원형 코팅정제	적합
비타민 B1(0.58mg/1600mg)	표시량의 80% ~ 180%	175%(1.014mg/1600mg)	적합
비타민 B2(0.68mg/1600mg)	표시량의 80% ~ 180%	100%(0.680mg/1600mg)	적합
비타민 B6(0.82mg/1600mg)	표시량의 80% ~ 150%	129%(0.799mg/1600mg)	적합
비타민 C(32.4mg/1600mg)	표시량의 80% ~ 150%	84%(27.23mg/1600mg)	적합
비타민 D(0.002mg/1600mg)	표시량의 80% ~ 180%	155%(0.0031mg/1600mg)	적합
비타민 E(7.2mg α-TE/1600mg)	표시량의 80% ~ 150%	98%(7.02mg α-TE/1600mg)(DL α-TE전환계수:1/2)	적합
비타민 A(0.237mg RE/1600mg)	표시량의 80% ~ 150%	93%(0.2195mg RE/1600mg)	적합

판정 : 적합

검사자 : 김영옥, 정재영, 이선정, 박상진, 김수희

책임자 : 정재영, 김천희

비고 :

※ 상기판정은 의뢰된 시험항목에 한함

<식품,의약품분야 시험·검사 등에 관한 법률>

제 11조 제2항 및 같은법 시행규칙 제12조 제4항에 따라 위와 같이 시험결과를 발급합니다.

2014년 11월 25일

한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원



○ 기존 해당 과제의 원료를 사용하여 비타민과 야관문이 함유된 제품의 검사성적 완료 하였으며 개별 인정 이후 해당 과제의 원료는 식품에 식용으로 등재되어 별도의 안전성 테스트는 불필요함. 또한, 추출시 주정 및 물추출이기 때문에 안전성 검사는 배제되나 추후 당사만의 원료 안전성 테스트를 추진 할 예정임.

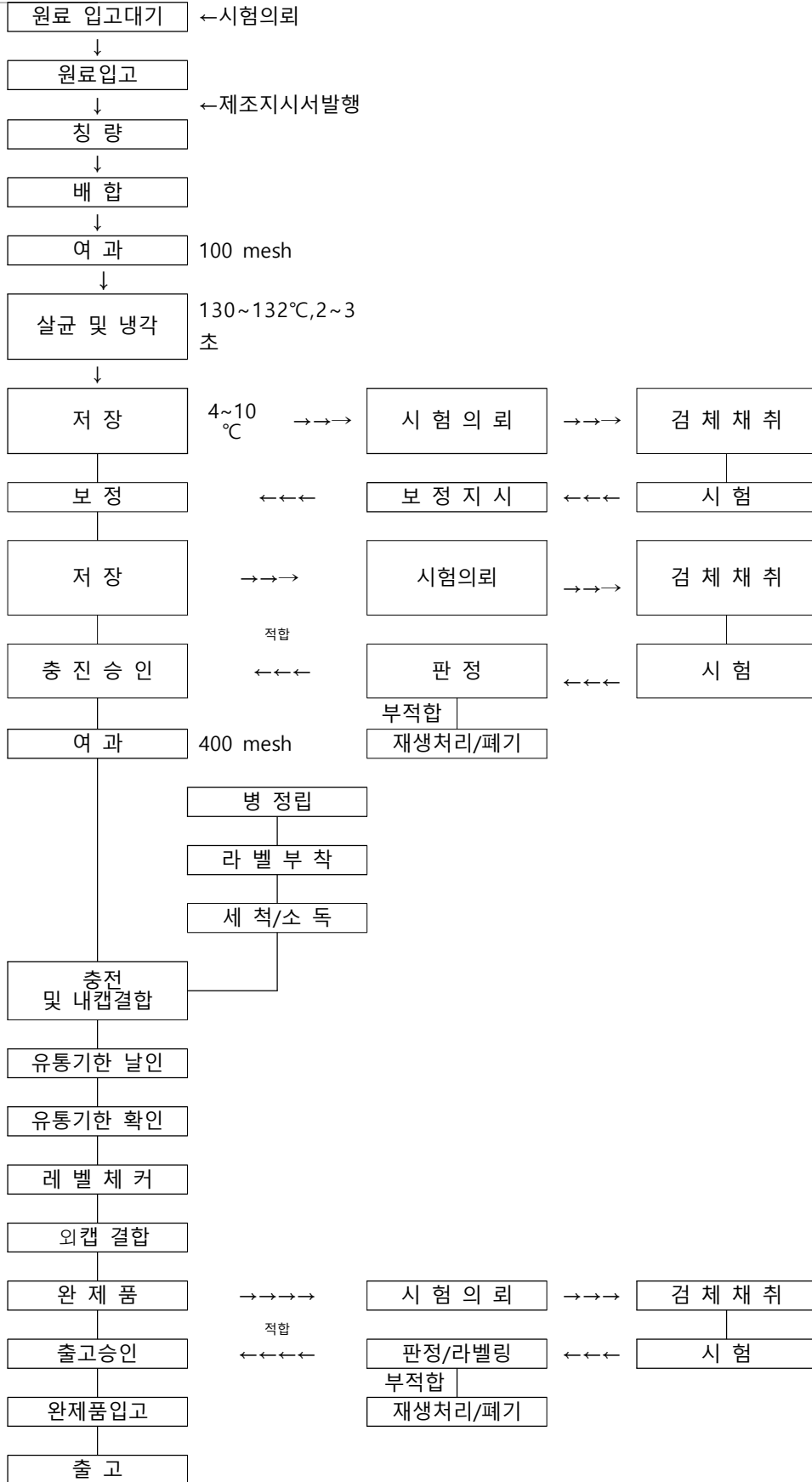
나. 2차년도

① 개발 목표

- 주관연구기관((주)네추럴웨이) : 개별인정 신청, 시제품 제작(제형별), 수출전략 마련

1. 음료 제조 공정도

1.1 액상



공정명	제조방법	검사 항목	기타 사항
1. 원료준비	<p>1. 원료 입고 - 발부와 납품된 원료, 부원료 및 내외포장재가 일치하는지 확인한다. - 시험 대기 장소로 해당 물품을 이동시킨다.</p> <p>2. 검사 - 원료, 부원료 및 내외포장재를 시험 의뢰한다. - 검체채취 및 '시험중라벨'을 부착한다. - 시험 결과 적합 시 '적합라벨'을 부착한다.</p> <p>3. 보관 - 원재료별 적합구역에 보관한다. - 부적합시 부적합 구역에 보관한다.</p>	<p>수량, 품목명, 포장 파손 여부등</p> <p>원자재별 시험항목</p>	<p>발주량, 실납품량의 일치 여부</p> <p>오염에 주의 검체 채취 된 원료의 재포장 철저</p> <p>부적합품 격리 보관</p>
2. 원료칭량	<p>1. 원료 인수 - 적합필증이 부착된 원료를 인수하고 원료명 및 유통기한, 한글표시사항등을 확인한다.</p> <p>2. 원료 칭량 - 제조지시서에 따라 원료를 칭량한다. - 원료는 18mesh망을 통과시켜 이물을 선별한다. - 원료는 용기에 계량하여 식별이 가능하도록 표시하고 잔여 원료는 위생적으로 처리하여 보관한다. - 칭량 완료된 원료는 원료 투입전 이상 유무를 다시 한 번 확인한다.</p>	<p>원료명 및 유통기한</p> <p>지시량 및 계측량 체망 mesh</p>	<p>칭량의 이중점검</p>
3. 배합	<p>1. 혼합탱크에 정제수를 정량중 일부만 투입한다.</p> <p>2. 액상 및 분말 원재료를 정량 투입한다.</p> <p>3. 교반속도 : 30rpm, 교반시간 30분 이상</p>	<p>교반조건</p>	
4.살균	<p>1. 여과 70mesh를 통과하여 음료의 청정도를 높인다.</p> <p>2. 살균 135±2℃ / 2~3초간 살균한다.</p> <p>3. 냉각 살균종료후 10℃로 냉각한다.</p>	<p>여과망 파손여부</p> <p>살균온도 및 시간</p> <p>냉각 온도</p>	<p>컨트롤 패널의 살균온도(설정 온도 및 실제 온도), outlet 온도를 확인</p>

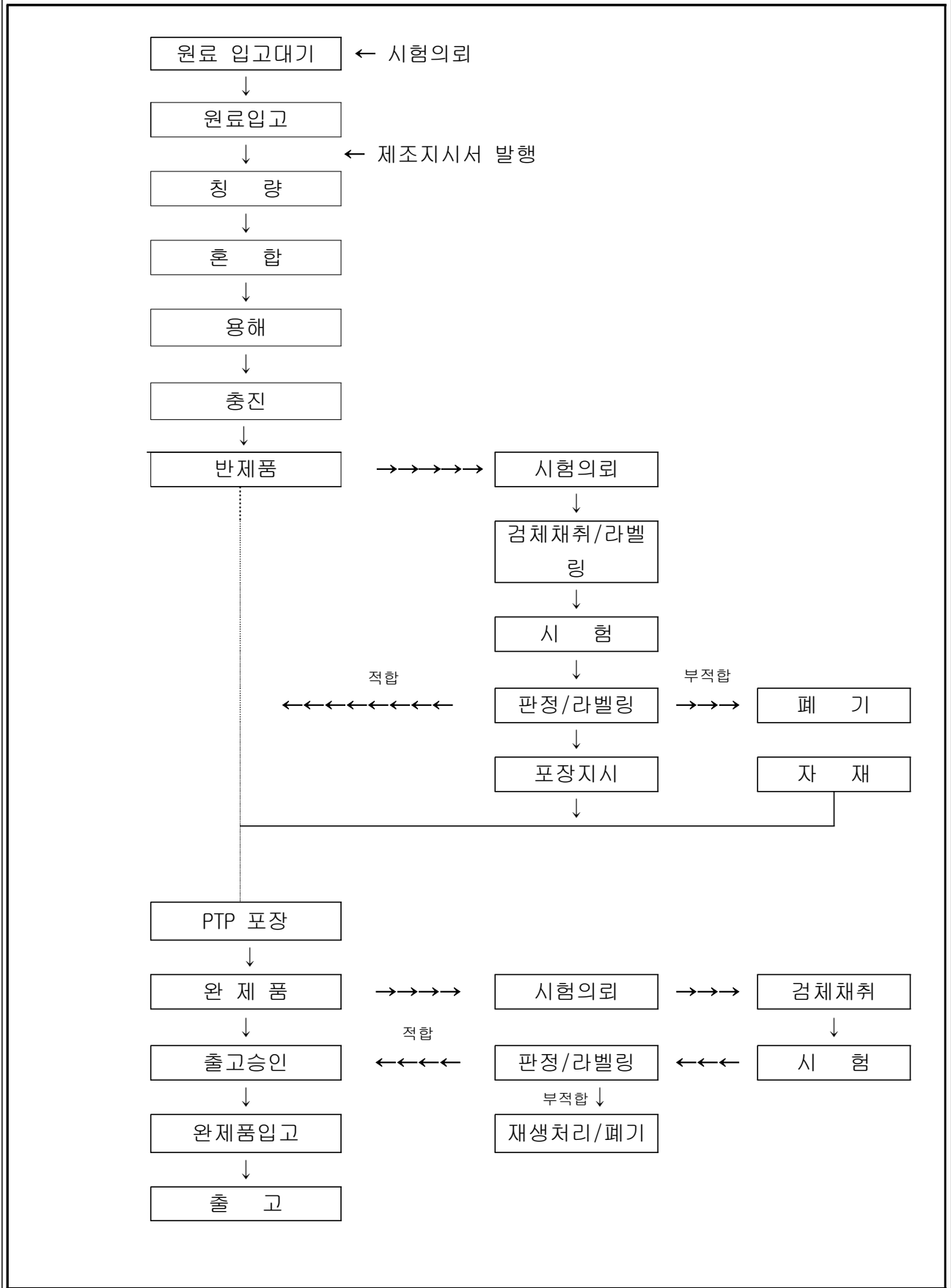
공정명	제조방법	검사 항목	기타 사항
5. 보정	<p>1. 저장 살균, 냉각된 제품을 4~10℃로 유지되는 저장 탱크에 넣고 저장한다.</p> <p>2. 보정 - 샘플콕을 통해 저장된 제품을 위생적으로 채취한다. - 제품의 당도를 확인후 6.9±0.2에 맞게 가수를 한다. - 가수 완료된 제품을 4~10℃로 저장한다.</p>	<p>저장 온도</p> <p>당도</p> <p>저장 온도</p>	<p>샘플콕은 70% 에탄올로 살균하여 교차오염 방지</p>
6. 여과	<p>400mesh 하우징 필터로 이송되는 제품을 여과한다.</p>	<p>하우징 필터 mesh 필터 파손상태</p>	
7. 충전 및 내캡 결합	<p>1. 충전 - 제품은 10℃이하가 유지되도록 이송 및 충전 준비하도록 한다. - 세병이 완료된 병에 정량 140ml±2% 되도록 충전한다. - 연속공정으로 내캡(이중캡)을 결합한다.</p>	<p>액상 온도 유지</p> <p>충전기 위생 상태</p> <p>내캡 교차오염 방지</p>	<p>생산중 액상 및 내캡이 교차오염이 발생하지 않도록 생산중 허퍼를 개봉 금지</p>
8. 유통기한 날인	<p>생산일로부터 15일이 되도록 유통기한 날인한다.</p>	<p>날짜, 인쇄크기, 위치</p>	
9. 유통기한 검사	<p>- 비전으로 유통기한 날인 상태를 확인한다. - 불량발생시 전후 20개 이상의 제품을 수거, 관찰한다.</p>	<p>날인 정상여부</p>	
10. 레벨체커	<p>- 레벨 센서를 이용하여 정량을 확인한다. - 불량발생시 전후 20개 이상의 제품을 수거, 관찰한다.</p>	<p>제품량 확인</p>	
11. 외캡 결합	<p>오버캡 충전기를 이용하여 내캡 충전 완료된 제품에 결합한다.</p>	<p>결합 확인</p>	
12. 검사	<p>완제품의 결합상태, 이물, 파손등을 확인하고 품질 실험을 실시한다.</p>	<p>품질시험결과</p>	
13. 완제품 입고	<p>10℃ 이하의 냉장창고에 제품을 입고, 출고대기 한다.</p>	<p>보관온도</p>	
14. 출하	<p>보관관리책임자는 출고전표를 받아 적합품에 한하여 출고한다.</p>	<p>품질시험결과</p>	



공정명	제조방법	검사 항목	기타 사항
1. 원료준비	<p>1. 원료 입고 - 발부와 납품된 원료, 부원료 및 내외포장재가 일치하는지 확인한다. - 시험 대기장소로 해당 물품을 이동시킨다.</p> <p>2. 검사 - 원료, 부원료 및 내외포장재를 시험의뢰한다. - 검체채취 및 '시험중라벨'을 부착한다. - 시험 결과 적합 시 '적합라벨'을 부착한다.</p> <p>3. 보관 - 원재료별 적합구역에 보관한다. - 부적합시 부적합 구역에 보관한다.</p>	<p>수량, 품목명, 포장 파손여부등</p> <p>원자재별 시험항목</p>	<p>발주량, 실납품량의 일치 여부</p> <p>오염에 주의 검체채취된 원료의 재포장 철저</p> <p>부적합품 격리 보관</p>
2. 원료칭량	<p>2. 원료 인수 - 적합필증이 부착된 원료를 인수하고 원료명 및 유통기한, 한글표시사항등을 확인한다.</p> <p>2. 원료 칭량 - 제조지시서에 따라 원료를 칭량한다. - 원료는 18mesh망을 통과시켜 이물을 선별한다. - 원료는 용기에 계량하여 식별이 가능하도록 표시하고 잔여 원료는 위생적으로 처리하여 보관한다. - 칭량 완료된 원료는 원료투입전 이상 유무를 다시 한 번 확인한다.</p>	<p>원료명 및 유통기한</p> <p>지시량 및 계측량 체망 mesh</p>	<p>칭량의 이중점검</p>
3. 유동층 과립	<p>1. 과립제조 바인더 정제수(투입량 대비 20% ± 5%) 제품온도 : 30~55℃ 수분함량 : 10±2% ※ 수분함량 기준 이탈시 35℃~45℃로 건조</p>	<p>정제수 투입량 제품온도 수분함량</p>	
4. 혼합	<p>1. 혼합 과립물 + 카르복시메틸셀룰로오스칼슘 + 스테아린산 마그네슘 혼합 혼합시간 : 20분</p>	<p>혼합량 및 혼합시간</p>	

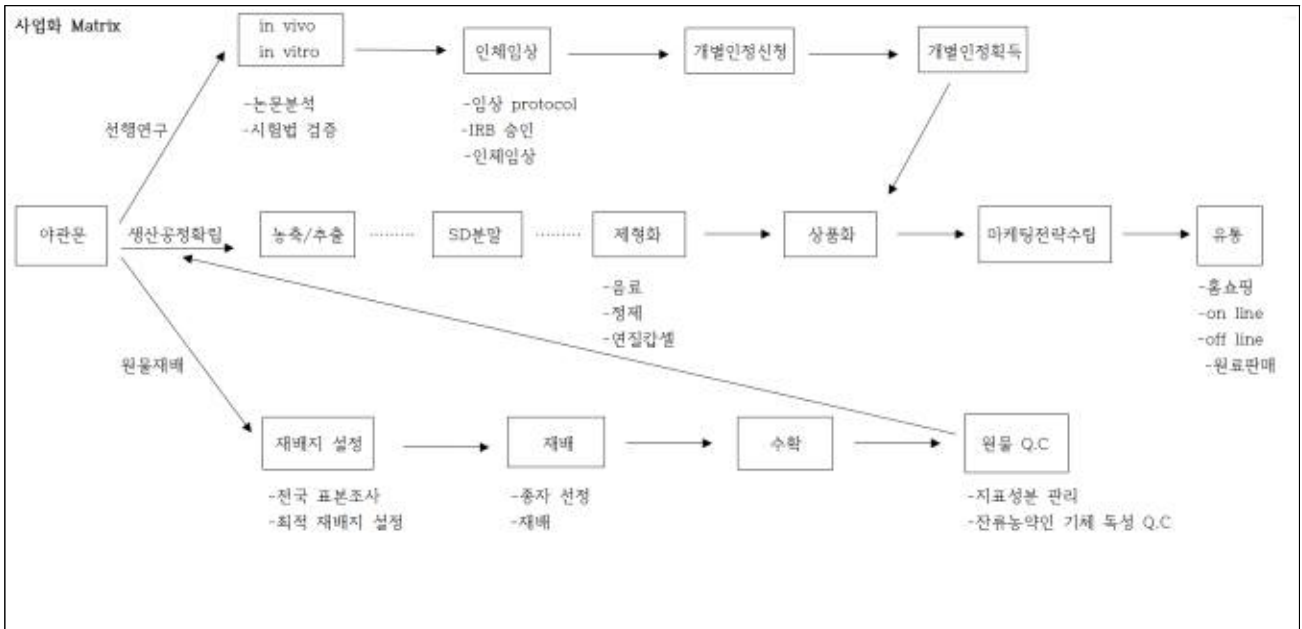
공정명	제조방법	검사 항목	기타 사항
5. 2차 타정	중량 : 792±24mg 경도 : 100~200N 두께 : 4.7mm이하	정제 규격	
6. 반제품포장	1. 비닐에 선별된 정제를 담고 제조일자, 로트 번호등을 기록하여 부착한다. 2. 반제품을 품질시험하여 적부를 확인한다.	품질시험결과	
7. 코팅	1. 1차 코팅 히드록시프로필메틸 셀룰로오스 칼슘	코팅제 두께(코팅상태)	
8. 선별	육안으로 성형불량 정제를 선별한다.	성형불량	
9. 정제포장	1. 병포장 : 병포장기의 정제 충전 호퍼에 적합 판정된 정제를 투입한후 포장중량에 맞게 포장한다. 2. PTP 포장 : PTP 포장 호퍼에 적합 판정된 정제를 투입하여 포장수량에 맞게 포장한다.	설비 작동 상태 충전 중량 품질시험결과	
10. 출하	보관관리책임자는 출고전표를 받아 적합품에 한하여 출고한다.	품질시험결과	

### 3. 연질 캡슐 제조 방법





순번	작업 공정명	주요 설비	작업내용
1	원료입고		보관관리책임자는 제조지시서와 원료가 일치하는지, 합격라벨 부착되었는지 확인하고 원료를 칭량전실로 반입한다. 제조관리담당자는 칭량전실의 원료를 칭량실로 이송한다.
2	칭량	전자저울	칭량순서는 가벼운 것부터 칭량한다. 2인1조로 각각 품목을 칭량하면서 제조지시서 내용과 일치 하는지 확인 후 칭량비닐에 담고 물품명세표를 부착한다. 칭량 순서대로 혼합실로 이송한다.
3	혼합	혼합기	혼합실에서 이송된 원료의 각각 무게를 재확인하고 제조지시서와 무게가 일치하는지 확인 후 묶음을 풀고 혼합기 바닥 가까이 달아서 넣는다. 완료되면 혼합기를 이용하여 90분간 균일하게 혼합한다.
4	용해	용해기	용해탱크에 정제수,글리세린,젤라틴,천연색소를 용해탱크에 차례로 투입한 후 약 15분간 교반하면서 약 85℃ 까지 가온하여 용해시킨고 감압하여 거품을 제거한 후 소분 탱크로 이송한다
5	충진	충진기	피막형성드럼의 온도를 12℃정도로 하여 피막을 형성시킨 후 성형롤러에 미리 용해한 내용액을 38℃ 조건에서 충진하면서 연질캡슐을 제조한다
6	반제품포장		비닐에 반제품 캡셀을 담고 제조일, 중량등을 기록한다.
			시험의뢰를 통해 Q.C에서 반제품 검사를 실시한다.
7	PTP포장	PTP포장기	800mg*10cap씩 PTP 포장한다. [히터예열(상,하):100~120℃, 접착:140~160℃, 절단:90~110℃의 조건]
8	포장	포장실	내용물이 충진된 PTP를 종이지함 포장 후 봉인스티커를 붙인다.
9		포장실	C/T박스에 넣어 완제품포장 후 완제품검사대기 장소로 옮긴다. Q.C에서 합격승인이 되면 완제품보관실로 옮긴다.
10	출하		보관관리책임자는 출고전표를 받아 적합품에 한하여 출고한다.



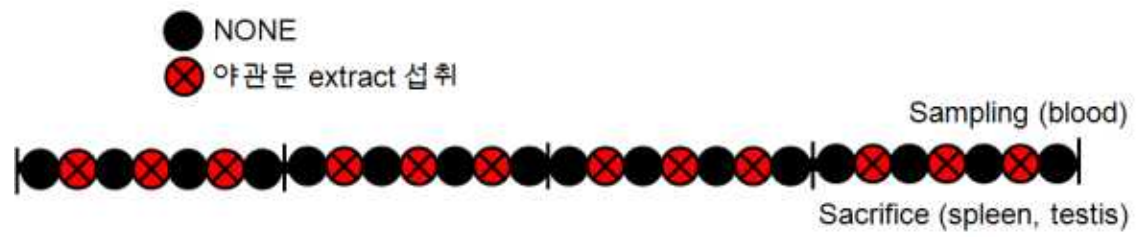
- 1협동연구기관(단국대학교병원) : KCI 급 이상 논문 게재, in vivo 및 in vitro 실험을 통한 야관문의 남성 갱년기 관련 유효성 및 안전성 평가, 유사제품 비교분석, 용량설정, 호르몬과 상호작용 규명

1. 샘플 설정

- ① 시기별 3종
- ② 지역별 2종
- ③ 양성대조군: 마카, 비아그라, 민들레추출물 3종
- ④ 음성대조군
- ⑤ 총 10군 (음성대조군 1, 양성대조군 3, 샘플 6)

2. 평가방법

- ① 동물모델 : 8주령 음성 SD rat, 군당 5마리씩 총 50마리
- ② 야관문 섭취기간 (4주)



- ③ 기간 중 일주일에 두 번씩 체중 측정
- ④ 5 주차 : 마취 후 혈청 채집, Sacrifice 후 비장, 고환 추출
  - 추출한 비장은 무게 측정 및 표면, 상태 등의 육안 평가
  - 추출한 고환 한쪽은 동결, 한쪽은 포르말린에 담가 탈수 및 매염과정을 거쳐 면역 염색 준비

3. 안전성 평가

① AST/ALT (간독성검사)

② BUN (신장독성 검사)

③ 비장 무게 측정

④ 체중 측정

#### 4. 유효성 평가

1) In-vitro

① NO 생성량 : 야관문추출물 농도의존적 NO생성량 평가

2) In-vivo

가) 성기능 평가

① 총테스토스테론 : 혈액검사 (ELISA)

② 17-beta HSD : 남성호르몬 생성기전, 혈액검사 (ELISA)

③ SHBG (Sexual hormone binding globulin) : 혈액검사 (ELISA)

나) 혈관기능 평가

① NO : 혈청샘플, ELISA, NO 측정 kit

② cGMP : 혈청샘플, ELISA

③ Prstaglandin (PGE) : 혈청샘플, ELISA

④ nNOS : 혈청샘플, ELISA

다) 지질대사기능 평가

① Total cholesterol, LDL-C, HDL-C 및 triglyceride : 혈청샘플, ELISA, 관련 측정 kit

라) 기타 기능 평가

① 혈당, 인슐린 : 혈청샘플, ELISA

- 2협동연구기관(중앙대) : 특허출원, 분석법의 신뢰성 검증(validation)

#### ○ 성분 함량기준 설정

- 표준물질의 함량시험 분석법 설정: 건강기능식품에서 지표성분인 표준물질의 함량을 정확히 측정하기 위해서는 적절한 분석법 설정이 필요함. 이를 위해 검액 제조, 용매, 컬럼, 분석과장, 온도에 대한 조건별 시험을 통해 최적의 HPLC 분석법을 설정함.

#### ○ 분석법 밸리데이션

- FDA guideline에 따라 지표성분의 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 감도에 대한 분석법의 유효성 검증

• 특이성(Specificity): 시험용액의 건강기능식품과 표준물질을 1:1(v:v)로 섞은 후 3회 분석하여 실측 함량비율 및 변동계수를 확인함.

• 직선성(Linearity): 표준물질 시료를 농도별(최소 5개)로 희석하여 3회 분석한 후 상관계수( $R^2$ )를 통해 직선성 여부를 확인하고 회귀방정식으로부터 역산출한 농도값에 대한 이론상 농도 값의 상대오차값을 확인함.

• 정확성(Accuracy): 농도별 표준물질 시료와 조제한 건강기능식품을 1:1(v:v) 비율로 혼합 후, 각 3회 분석하여 검량선을 이용하여 역산된 평균농도와 이론치의 상대오차, 변동계수를 확인하여 정확성의 허용기준(상대오차: 90~110%, 변동계수: 2% 미만)에 적합한지 확인함.

• 정밀성(Precision)

\* 반복성: 표준물질을 일정농도에 대하여 10회 분석하여 유지시간 측정값의 변동계수와 분석면적

측정값의 변동계수를 허용기준 (유지시간 변동계수: 1% 미만, 분석면적 변동계수: 2% 미만)에 적합한지 확인함.

- \* 일내정밀성: 농도별 표준물질 용액을 짧은 시간차로 반복 분석하여 얻은 측정값들 사이의 상대 오차 및 변동계수 확인함(허용기준 - 상대오차: 90~110%, 변동계수: 2% 미만).
- \* 일간정밀성: 농도별 표준물질 용액을 다른 실험일, 다른 시험자, 다른 분석장비 등을 이용하여 분석 실험한 측정값들 사이의 상대오차 및 변동계수 확인함(허용기준 - 상대오차: 90~110%, 변동계수: 2% 미만).

• 범위(Range): 적절한 정밀성, 정확성 및 직선성이 입증되는 표준물질의 농도의 상한 및 하한값 사이의 영역을 설정함.

② 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

○ 연구개발성과

가. 1차년도

성과목표	사업화지표										1연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품종 등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용 창출	투자유치		논문		학술 발표			정책 활용	홍보 전시	
												SCI	비SCI						
최종목표	2	1			3	140		28	1	1	1	1	2		2	1	13		
1차년도	목표	1						3				1	1		1				
	실적	1						3				1	2		1				
달성율(%)	100							100				100	100		100				

1. 논문게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일
1	(-)-9'-O-( $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl)lyoniresinol from <i>Lespedeza cuneata</i> suppresses ovarian cancer cell proliferation through induction of apoptosis)	<i>Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters</i>	백지원	28	대한민국	ScienceDirect	비SCI	2018.01.15



Contents lists available at ScienceDirect

## Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl



(-)-9'-O-( $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl)lyoniresinol from *Lespedeza cuneata* suppresses ovarian cancer cell proliferation through induction of apoptosis

Jiwon Baek<sup>a,h</sup>, Dahae Lee<sup>a,h</sup>, Tae Kyoung Lee<sup>a</sup>, Ji Hoon Song<sup>b</sup>, Ju Sung Lee<sup>c</sup>, Seong Lee<sup>d</sup>, Sang-Woo Yoo<sup>e</sup>, Ki Sung Kang<sup>f</sup>, Eunjung Moon<sup>g</sup>, Sanghyun Lee<sup>c,\*</sup>, Ki Hyun Kim<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 16419, Republic of Korea

<sup>b</sup> Department of Medicine, University of Ulsan College of Medicine, Seoul 05505, Republic of Korea

<sup>c</sup> Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University, Anseong 17546, Republic of Korea

<sup>d</sup> Dankook University Hospital Research Institute of Clinical Medicine, Cheonan 31116, Republic of Korea

<sup>e</sup> Research & Development Center, Natural Way Co., Ltd., Pocheon 11160, Republic of Korea

<sup>f</sup> College of Korean Medicine, Gachon University, Seongnam 13120, Republic of Korea

<sup>g</sup> Charmzone R&D Center, Charmzone Co. Ltd., Seoul 135-851, Republic of Korea

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 August 2017

Revised 24 November 2017

Accepted 27 November 2017

Available online 28 November 2017

## Keywords:

*Lespedeza cuneata*

Fabaceae

(-)-9'-O-( $\alpha$ -L-Rhamnopyranosyl)

lyoniresinol

A2780 ovarian carcinoma cells

Apoptosis

Caspase

## ABSTRACT

*Lespedeza cuneata* (Dum. Cours.) G. Don. (Fabaceae), known as Chinese bushclover or sericea lespedeza, has been used in traditional medicine to treat diabetes, hematuria, and insomnia, and it has been reported that bioactive compounds from *L. cuneata* possess various pharmacological properties. However, there has been no study to determine the active compounds from *L. cuneata* with potential activity against ovarian cancer. This study aimed to isolate cytotoxic compounds from *L. cuneata* and identify the molecular mechanisms underlying the apoptosis pathway in ovarian cancer cells. Based on cytotoxic activity identified in the screening test, chemical investigation of the active fraction of *L. cuneata* led to the isolation of nine compounds including four lignanosides (1–4), three flavonoid glycosides (5–7), and two phenolics (8–9). Cytotoxicity and the molecular mechanism were examined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay and Western blot analysis. Of the isolated compounds, (-)-9'-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)lyoniresinol (3) demonstrated the strongest effect in suppressing A2780 human ovarian carcinoma cell proliferation in a dose-dependent manner, with an IC<sub>50</sub> value of 35.40 ± 2.78  $\mu$ M. Control A2780 cells had normal morphology, whereas cell blebbing, shrinkage, and condensation were observed after treatment with compound 3. Western blotting analysis showed that compound 3 inhibited A2780 human ovarian cancer cell viability by activating caspase-8, caspase-3, and PARP, which contributed to apoptotic cell death. These results suggest that (-)-9'-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)lyoniresinol (3) has potent anticancer activities against A2780 human ovarian carcinoma cells through the extrinsic apoptotic pathway. Therefore, (-)-9'-O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)lyoniresinol is an excellent candidate for the development of novel chemotherapeutics.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 2. 학술발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2016 한국응용생명화학학회 천연물분과 및 충청지회 합동 심포지엄	이상현	2016.11.04	대전	대한민국
2	2017 International symposium and Annual Meeting of the KSABC	이주성	2017.06.15	부산	대한민국

3. 인력양성

No 1	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	양성	2017		2			2			2			

나. 2차년도


성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인 력 양 성	정책 활용 홍 보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SC I	비 SC I						
최종목표	2	1			3	14 0		28	1	1	1	1	2		2	1	13		
2차 년 도	목 표	1			3			3			1		1		1				
	실 적	1			3						2		3		1				
달성율(%)	10 0				10 0						10 0		10 0		10 0				

1. 논문게재

No	논문명	학술지명	주저 자명	호	국명	발행 기관	SCI여 부 (SCI/ 비SCI )	게재일
1	Lignan Glycosides and Flavonoid Glycosides from the Aerial Portion of <i>Lespedeza cuneata</i> and Their Biological Evaluatioons	<i>Molecules</i>	백지원		스위스	MDPI	SCI	2018.08.01
2	Aqueous extract of <i>Lespedeza cuneata</i> improves male menopause by increase of nitric oxide and dihydrotestosterone	<i>Food Science and Biotechnology</i>	이연희	28(1)	대한민 국	KoSFoST	SCI	2019.02.28

Article

# Lignan Glycosides and Flavonoid Glycosides from the Aerial Portion of *Lespedeza cuneata* and Their Biological Evaluations

Jiwon Baek <sup>1</sup>, Tae Kyoung Lee <sup>1</sup>, Jae-Hyoung Song <sup>2</sup>, Eunyong Choi <sup>3</sup>, Hyun-Jeong Ko <sup>2</sup>, Sanghyun Lee <sup>4</sup>, Sang Un Choi <sup>5</sup>, Seong Lee <sup>6</sup>, Sang-Woo Yoo <sup>7</sup>, Seon-Hee Kim <sup>3</sup> and Ki Hyun Kim <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> School of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 16419, Korea;

<sup>2</sup> College of Pharmacy, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea;

<sup>3</sup> Sungkyun Biotech Co. Ltd., Suwon 16419, Korea;

<sup>4</sup> Department of Integrative Plant Science, Chung-Ang University, Anseong 17546, Korea;

<sup>5</sup> Korea Research Institute of Chemical Technology (KRICT), Daejeon 34114, Korea;

<sup>6</sup> Dankook University Hospital Research Institute of Clinical Medicine, Cheonan 31116, Korea;

<sup>7</sup> Research & Development Center, Natural Way Co., Ltd., Pocheon 11160, Korea;

\* Correspondence: .

Received: 9 July 2018; Accepted: 30 July 2018; Published: 1 August 2018



**Abstract:** *Lespedeza cuneata* (Fabaceae), known as Chinese bushclover, has been used in traditional medicines for the treatment of diseases including diabetes, hematuria, and insomnia. As part of a continuing search for bioactive constituents from Korean medicinal plant sources, phytochemical analysis of the aerial portion of *L. cuneata* led to the isolation of two new lignan glycosides (1,2) along with three known lignan glycosides (3–7) and nine known flavonoid glycosides (8–14). Numerous analysis techniques, including 1D and 2D NMR spectroscopy, CD spectroscopy, HR-MS, and chemical reactions, were utilized for structural elucidation of the new compounds (1,2). The isolated compounds were evaluated for their applicability in medicinal use using cell-based assays. Compounds 1 and 4–6 exhibited weak cytotoxicity against four human breast cancer cell lines (Bt549, MCF7, MDA-MB-231, and HCC70) ( $IC_{50} < 30.0 \mu M$ ). However, none of the isolated compounds showed significant antiviral activity against PR8, HRV1B, or CVB3. In addition, compound 10 produced fewer lipid droplets in Oil Red O staining of mouse mesenchymal stem cells compared to the untreated negative control without altering the amount of alkaline phosphatase staining.

## 논문게재예정증명서

제 목 : Aqueous extract of *Lespedeza cuneata* improves male  
menopause by increase of nitric oxide and  
dihydrotestosterone

저 자 : Yun-Hee Rhee<sup>1,3,\*</sup>, Sang-Woo Yoo<sup>2</sup>, Seong Lee<sup>3</sup>, Phil-Sang  
Chung<sup>1,3,4</sup>

저자 소속 : <sup>1</sup>Beckman Laser Institute Korea, Dankook University,  
<sup>2</sup>Natural way co.,Ltd, <sup>3</sup>Laser Translational Clinical Trial  
Center, Dankook University Hospital, <sup>4</sup>Department of  
Otolaryngology-Head and Neck Surgery, College of Medicine,  
Dankook University

위의 논문은 사단법인 한국식품과학회 발행  
Food Science and Biotechnology Vol. 28 No. 1  
(2019년 2월 28일 발간예정)에 게재예정임을 증명합니다

2018년 7월 9일

사 단 법 인 한국식품과학회  
회 장 황 재





No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	한국자원식물학회 춘계학술발표회	Norman Quilantang	2018.04.27	국립생태원 생태교육관 대강당	대한민국
2	원예과학기술지	이상현	2018.05.24	대전컨벤션센터	대한민국
3	International symposium and Annual Meeting of the KSABC	이주승	2018.06.18	ICC Jeju	대한민국

2. 학술발표

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

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	야관문 추출물의 분획물을 포함하는 암의 예방 또는 치 료용 약학적 조성 물	대한민국	중앙대 학교 산학협 력단	2018.01. 12	10-2018-0 0004289				100

### 출원번호통지서

출원 일자 2018.01.12  
 특기사항 심사청구(유) 공개신청(무) 참조번호(MP17214)  
 출원번호 10-2018-0004289 (진수번호 1-1-2018-0038685-03)  
 출원인명칭 중앙대학교 산학협력단(2-2004-038530-5)  
 대리인성명 이명진(9-2003-000220-3)  
 발명자성명 이상현 이성 김기현 백지현 유상우 강기성 이다혜 이주성  
 발명의명칭 야관문 추출물의 분획물을 포함하는 암의 예방 또는 치료용 약학적 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), 정정 신고서]를 제출하여야 출원 이후의 각종 통지서를 정상적으로 받을 수 있습니다.  
※ 특허포(patent.go.kr) 접속 > 민원서신다운로드 > 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 [전자적교환가서(PTO/5B/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. 출원인이 직무수행과정에서 개발한 발명을 사용자(기업)가 명확하게 승계하지 않은 경우, 특허법 제62조에 따라 심사단계에서 특허거절결정되거나 특허법 제133조에 따라 등록이후에 특허무효사유가 될 수 있습니다.
8. 기타 심사 절차에 관한 사항은 동봉된 안내서를 참조하시기 바랍니다.

4. 인력양성

No 1	분류	기준 년도	현 황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	양성	2018		1			1		1				

○ 연구 결과

1. 1차년도

<주관기관 : (주)네추럴웨이>

야관문 제품 제조공정도



-실험실단계의 추출조건 최적화 탐색

1. 추출용매의 결정

-원료의 추출에 사용되는 추출용매의 선택

- 1) 공전3장 개별기준 및 규격 또는 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 적합한 원료 사용 (정제수)

-추출에 이용된 정제수 성적서

발주처: 경기 포천시 해룡로 83-135  
 (주)내추럴웨이 최종현 귀하

11160

수질검사성적서					
수신: (주)내추럴웨이 최종현			발신: 중앙생명과학원(주)서울연구원		
제목: 수질검사성적서 교보			발급번호: CT643369		
			발급일: 2016년 9월 13일		
「먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙」 제3조제2항에 따라 다음과 같이 먹는물 수질검사성적서를 발급합니다. 이 성적서는 의뢰인이 제시한 시료에 대한 결과이며 검사목적 이외에는 사용할 수 없습니다.					
1. 시료 내용					
접수번호	WT16-5545	접수일	2016년 8월 31일		봉인공무원
의뢰인	상호(명칭): (주)내추럴웨이, 성명(대표자): 최종현		소속		
시료명	지하수(음용수)		직급	사무7급	
검사목적	정기검사(식품위생법)		성명	이은규	
채수장소	경기 포천시 해룡로83-135				
채수방법		채수일시	2016-08-31		의뢰근거
2. 수질검사 결과					
검사항목	기준	검사결과	검사항목	기준	검사결과
일반세균	100 CFU/mL이하	0	벤젠	0.01 mg/L이하	불검출
총대장균군	불검출/100mL	불검출	톨루엔	0.7 mg/L이하	불검출
분변성대장균군	불검출/100mL	불검출	메틸벤젠	0.3 mg/L이하	0.001
대장균	불검출/100mL	불검출	크실렌	0.5 mg/L이하	불검출
납	0.01 mg/L이하	불검출	1,1-디클로로에틸렌	0.03 mg/L이하	불검출
물소	1.5 mg/L이하	불검출	사염화탄소	0.002 mg/L이하	불검출
비소	0.01 mg/L이하	불검출	1,2-디브로모-3-클로로프로판	0.003 mg/L이하	불검출
염화물	0.01 mg/L이하	불검출	1,4-다이옥산	0.05 mg/L이하	불검출
수온	0.001 mg/L이하	불검출	중도	1,000 mg/L이하	105
시안	0.01 mg/L이하	불검출	과일간산칼륨소비량	10 mg/L이하	3.0
크롬	0.05 mg/L이하	불검출	냄새	무취	없음
암모니아성질소	0.5 mg/L이하	불검출	맛	무미	없음
질산성질소	10 mg/L이하	3.0	중(구리)	1 mg/L이하	0.010
카드뮴	0.005 mg/L이하	불검출	색도	5도이하	불검출
보소(보통)	1.0 mg/L이하	불검출	세제(음이온계면활성제)	0.5 mg/L이하	불검출
과산화수소	0.005 mg/L이하	불검출	수소이온농도	5.8 ~ 8.5	6.2
다이아지논	0.02 mg/L이하	불검출	아연	3 mg/L이하	2.821
말라티온	0.06 mg/L이하	불검출	염소이온	250 mg/L이하	34.8
피니트호티온	0.04 mg/L이하	불검출	철	0.3 mg/L이하	불검출
카바틸	0.07 mg/L이하	불검출	망간	0.3 mg/L이하	0.006
1,1,1-트리클로로에탄	0.1 mg/L이하	불검출	탁도	1 NTU 이하	0.40
테트라클로로에틸렌	0.01 mg/L이하	불검출	황산이온	200 mg/L이하	5
트리클로로에틸렌	0.03 mg/L이하	불검출	알루미늄	0.2 mg/L이하	불검출
디클로로에탄	0.02 mg/L이하	불검출			
판정	적합				
수질기준초과항목					

중앙생명과학원(주) 서울연구원 대표이사



- 환경과 생명을 소중히 하는 아름다운 기업 -

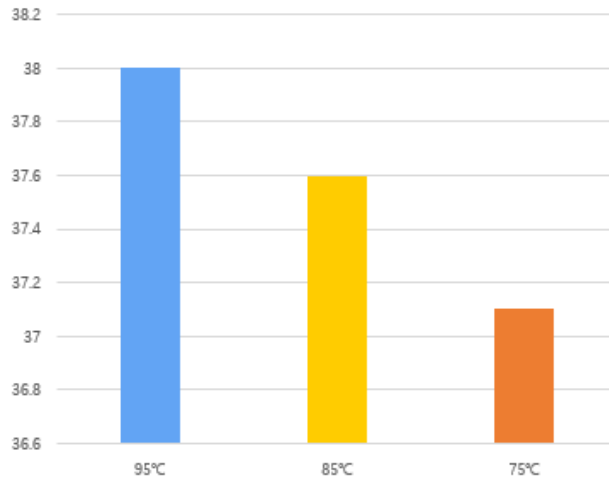
## 2. 추출 온도의 영향

(240g 사용)

시료 40g, 시료량대비 10배 용매사용 (시료를 건조하여 55℃ 수분(13%이하)을 제거한 후)

구분	시료1	시료2	시료3
전처리	파쇄	파쇄	파쇄
추출온도	75	85	95
추출용매	정제수	정제수	정제수
시간(h)	10*6회 / 60시간	10*6회 / 60시간	10*6회 / 60시간
추출수율	37.1%	37.6%	38.0%

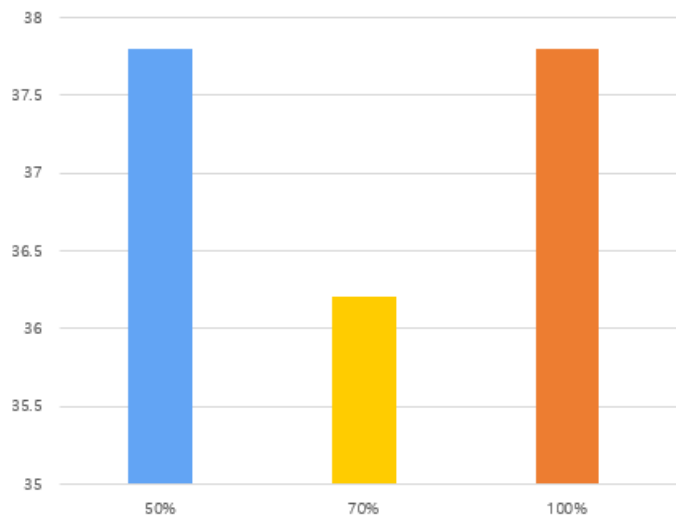
추출온도의 영향



### 3. 추출 용매의 영향

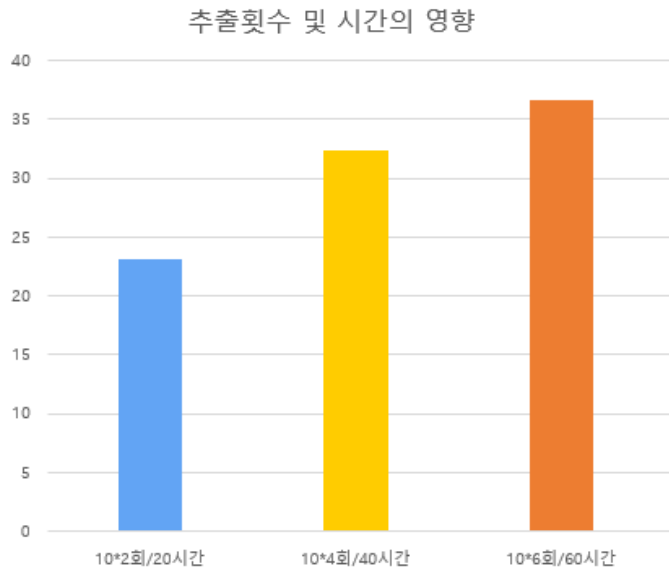
구분	시료4	시료5	시료6
전처리	파쇄	파쇄	파쇄
추출온도	95	95	95
추출용매	50% 정제수	70% 정제수	100% 정제수
시간(h)	10*6회 / 60시간	10*6회 / 60시간	10*6회 / 60시간
추출수율	37.8%	36.2%	37.8%

추출용매의 영향



#### 4. 추출 횟수 및 시간의 영향

구분	시료7	시료8	시료9
전처리	파쇄	파쇄	파쇄
추출온도	95	95	95
추출용매	100%정제수	100%정제수	100%정제수
시간(h)	10*2회 / 2시간	10*3회 / 30시간	10*5회 / 50시간
추출수율	23.1%	32.4%	36.7%
농축	40brix	40brix	40brix



#### 5. 온도, 용매, 추출시간 따른 추출 수율의 변화

구분	시료1	시료2	시료3	시료4	시료5	시료6	시료7	시료8	시료9
추출수율 (%)	37.1%	37.6%	38.0%	37.8%	36.2%	37.8%	23.1%	32.4%	36.7%
온도(°C)	75°C	85°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C	95°C
용매(%)	100%	100%	100%	50%	70%	100%	100%	100%	100%
비타민 (mg/g)	3.37	4.14	4.54	3.11	3.57	3.81	2.03	2.63	3.28

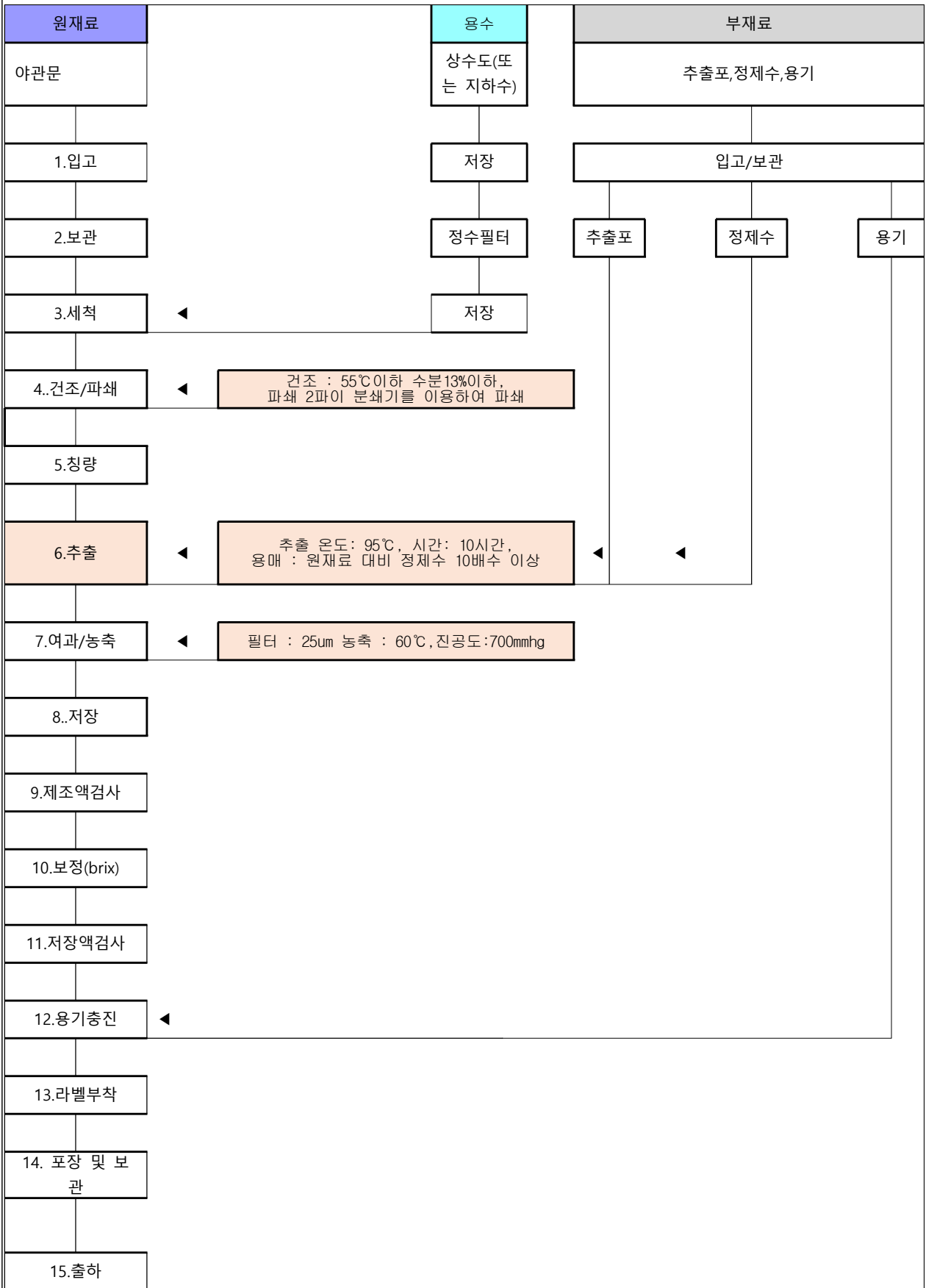
**6.종합**

조건	결과
원재료의 분쇄도	용매와 용질의 접촉 면적이 넓어짐으로 확산속도가 증가하여 추출 속도 증가에 따라 설정함 (2파이 분쇄)
추출온도	온도는 높을수록 추출은 잘되지만 불필요한 성분의 용출이 증가하고 열에 약한 기능성분의 불활성화를 고려하여 설정함 (95℃)
추출시간	시간은 길어질수록 확산평형(diffusion equilibrium)이 이루어지며 불순물의 유출이 늘어나 유효성분의 농도가 낮아지므로 기능성분 함량이 가장 우수한 시간 설정 (10시간)
추출농도	원재료의 용매의 비율을 높이면 농도차가 커져서 확산 속도는 빨라지지만 단위 처리량이 작아지고 농축해야할 용액이 많아져 생산성이 떨어짐, 하지만 야관문 유효성분을 최대한 추출하기 위하여 용매의 량은 많을수록 좋다고 판단됨 (시료량 대비 10배)
용매의 설정	수율은 정제수의 온도가 증가함에 따라 증가하는 경향을 보였고 비텍신은 농도와 온도가 증가함에 따라 비텍신이 증가하는 경향을 확인할 수 있다. 그러나 이를 원료대비로 보면 일반적인 경향은 증가되나 그 차이가 크지 않았다. 야관문의 수율은 50%와 70%로 크게 향상되지 않았으나 비텍신 함량은 계속 증가되는 경향이 있다. 야관문추출물의 수율과 작업성을 고려할 때 비텍신과 엑기스의 용출율이 높으며 또한 순수 비텍신의 용출율이 가장 높은 정제수 100%가 적합한 것으로 사료되었다.

**7.제조공정 표준화공정**

공정		WeightorVol.	Brix	회수액(ml)	고형분(g)	비텍신
1차	원재료	40g	-	400ml	-	-
	용매(정제수)	400ml				
	추출 95℃	4	-	-	-	-
		8	-	-	-	-
		12	-	-	-	-
		16	-	-	-	-
		20	-	-	-	-
	24	4.6	-	16g	4.54 (mg/g)	
잔사 무게	25g(62.5%)					
농축 (여과25um,60℃)	12hr	27	40.48ml	16g		
	24hr	40				
건조 (sd,fd,vd)	-					
건조 (FD)	-					
최종수율	37.5%					

### 8. 야관문 추출물 제조공정도



## 9. 야관문추출물 생산공정

- 1)입고 : 질량표준에 맞게 야관문을 검측, 검측 합격 후 입고한다.
- 2)보관 : 원료 보관 기준(실온, 상온, 냉장, 냉동)에 적합하도록 구분하여 보관한다.
- 3)세척: 흙 또는 남아있는 이물을 제거하기 위해 야관문을 세척한다.
- 4)건조/파쇄: 55℃ 이하에서 열풍으로 수분함량 13% 이하가 될 때까지 건조 후 2파이 파쇄기로 파쇄
- 5)칭량: 제조서 기준에 입각하여 정량을 계량하여 준비한다.
- 6)추출: 야관문 원료를 95℃조건에서 10배량의 정제수를 이용하여 10시간 추출, 6번 추출, 추출액 모음.
- 7)여과/농축: 추출액을 여과막(10~50 $\mu$ m)에 여과, 농축: 추출액을 -0.08MPa~-0.093MPa, 60℃ 조건에서 진공농축(상대 밀도1.30~1.35)
- 8)저장: 농축액을 저장탱크로 이송한다.
- 9)제조액 검사: 야관문 농축액의 지표성분 및 미생물안전성을 확인한다.
- 10)보정: 원하는 brix만큼 정제수를 이용하여 보정한다.
- 11)저장액 검사: 보정된 농축액의 기준규격을 확인한다. (거래처 요청에 의한 brix, 지표성분함량)
- 12)용기 충전: 생산된 농축액을 보관용기에 맞게 충전한다.
- 13)라벨부착 : 식품위생법에 의거하여 한글표시사항 라벨을 부착한다.
- 14)포장 및 보관: 합격제품은 외포장 및 포장 상태 검사, 완성품은 서늘하고 건조한 창고에 보관.
- 15)출하: 출하 요청 및 물품 출납증 확인 후 출고한다.



10. 야관문 추출분말 작업일보(예)

추출 작업 일보			작업자	김영호
			일자	2016.11.03(목)
업체명(원료)	네추럴웨이 (야관문)	순환 추출기 구분	4.5t 순환추출 system	
원료 입고 일자	2016.11.03(목)	원료량(kg)	200kg	
작업기간	2016.11.03.(목) - 2016.11.03(목)			
작업공정	투입원료량(kg) / 용매량(L)	전처리 여부	비고	
	200kg/4,100L	-	-	

\* 작업 공정 FLOW  
원료(200KG) / 상수 (4,100L) 추출 -> 부직포, 1um filter 1ea ->2차 이송 ->농축

추출공정								
횟수	용매명 - 용매량(L)				온도	압력	시간	비고
	용매1	용매2	용매3	계				
1#	상수			상수	100℃	-	11:50~ 21:50	
	4,100L			4100L			~	
					추출량	Brix	고형분 량	수율
					3,550 L	1Brix	35.5kg	17.7%
2#	용매1	용매2	용매3	계				
					추출량	Brix	고형분 량	수율
3#	용매1	용매2	용매3	계				
					추출량	Brix	고형분 량	수율

특이사항

농축 작업 정보			작업자	금영호				
			일자	2016.11.04(금)				
업체명(원료)	네추럴웨이 (야관문)	순환 농축기 구분	4.5t 순환농축 system					
원료 입고 일자	2016.11.03(목)	원료량(L)	3550L	여과	부직포.1um 필터			
작업기간	2016.11.04(금)~2016.11.04(금)							
농축공정								
시각 (시:분)	온도(℃)			진공도 (mmHg)	Brix	농축 액량 (L)	공급량 (L)h	비고
	원액	농축액	냉각수					
10:15	농축시작			700	1Brix	-	700	
11:00	67.8	68.7	28	700	-	-	800	
12:00	67.8	68.7	28	700	-	-	800	
14:00	67.8	68.7	28	700	-	-	400	
14:50	67.8	68.7	28	700	-	-	800	
15:50	최종 농축물 11brix 250L							
농축결과								
농축결과	농축			농축액				
	Brix	액량(L)		Brix	액량(L)	포장단위		
야관문-1	1Brix	3350L		11Brix	250L			
<p style="text-align: center;">특이사항</p> <p style="text-align: center;">야관문-2와같이 말토덱스트린 혼합후 분무건조기로 이송시킨다.</p>								

분무건조 작업 정보			작업자	금영호					
			일자	2016.11.07(월)					
업체명(원료)	네추럴웨이	분무건조기 구분	춘천 바이오 분무건조기(대)						
원료 입고 일자	2016.11.07(월)	원액량(L)	약 530L	Brix	12Brix				
텍스트린 첨가량(kg)	10kg	고형분량 합계(kg)	약63.k g	원액량 합계(L)	530L				
총 생산 예상량(kg)	530L X 12 Brix = 63.6kg								
rpm(%)	14,609(70%)	Double damper	(70/3) sec						
작업기간	2016.11.07(월)~2016.11.07(월)								
시각 (시 : 분)	온도(℃)					Chamber 차압 (송풍/배풍)	공급량( %)	feed 압 (bar)	비 고
	송풍	배풍	air broo m	이송	액온				
11:20	188.3	93.0	90.0	30.2	67.2	-69.5 (100/94.4)	25.2	0.7	
12:00	1차수거,11.9kg								
12:30	2차수거 11kg								
13:00	3차수거 11.7kg								
13:30	4차수거 11.55kg								
14:00	5차수거 8.8kg								
14:40	6차수거 5.75kg (건조 종료)								
	최종 : 60.7kg (3시간 20분)								
<b>건조결과</b>									
건조물 (air 회수)	-	총생산 량 (kg)	60.7k g	생산수율(%)	95.44	가동시간 (h)	3시간20분		
특이사항									

11. 야관문추출분말 품목제조보고 현황

## 제조방법설명서

1. 제품명 : 야관문추출분말
2. 식품의 유형 : 기타가공품
3. 원재료명 또는 성분명 및 배합비율(%)

야관문추출물	80.00
덱스트린	20.00
합 계	100.00

※ 야관문추출물 : 야관문 100%

4. 제조방법설명

- 1) 검사 : 상기원료를 엄선 구매하여 규격 및 기준검사를 한 후 합격품만을 원료로 사용한다.
- 2) 반제품(야관문추출물)제조 (유통기한 제조일로부터 12개월)
  - 2)-1 투입,추출 : 추출탱크에 야관문(비수리)를 일정량 계량하여 투입하고 정제수를 약 10배수 투입하고 95℃에서 약 10시간동안 추출하고 청징하게 여과한다.
  - 2)-2 농축 : 2)-1의 여과액을 농축기를 이용하여 농축하여 원료로 사용한다.
- 3) 용해 : 상기원료를 원액탱크에 순서별로 투입하고 균일하게 혼합, 용해한다.
- 4) 살균 : 3)의 원액을 80도에서 10분간 살균시킨다.
- 5) 분무건조 : 4)의 살균된 원액을 분무건조기를 이용하여 건조하고 분말화한다.
- 6) 검사,포장 : 5)의 분말을 규격 및 기준에 따라 시험하고 적합여부를 확인하여 포장한다.

5. 용도 용법 : 스프, 일반가공식품, 제과 및 스낵 등 식품제조가공용원료소재로서 제품별 적정량 사용.

6. 보관방법 : 직사광선을 피하고 건조한곳에 실온보관  
포장재질 : 폴리에틸렌.

7. 포장방법 : 내포장(폴리에틸렌)용기, 외포장(지대 또는 박스) 밀봉포장.  
포장단위 : 5kg, 10kg, 15kg, 20kg

8. 성상 : 이미, 이취가 없고 고유의 풍미와 색택을 지닌 미세의 분말

9. 유통기한 : 제조일로부터 02년까지

## 12. 완제품 상세 공정도



**Bottom spray**

- ✓ 유동층 코팅기
- ✓ (Fluid bed coater)



**Top spray**

- ✓ 유동층 과립기
- ✓ (Fluid bed granulator)



**Lap 유동층**

- ✓ 다양한 테스트
- ✓ 최상의 제품 생산



**품질관리**

- ✓ 엄격한 품질관리
- ✓ 입도, 수분 등 기준규격 검사



**타정**

- ✓ 레일 및 턴테이블 방식



**코팅**

- ✓ 하이코타 방식



**선별 및 검수**

- ✓ 자동정제 선별기를 통한 검수



**포장 Type**

- ✓ PTP, 자동병충진기
- ✓ 최적의 포장방법 확인

- (1) 원료 : 모든 원료를 원료규격에 맞는지 시험 후 적합 판정을 받은 원료를 사용한다.
- (2) 칭량 : 각각의 원료를 배합비에 맞게 전자저울을 이용하여 정확히 칭량한다.
- (3) 과립 및 건조 : 과립기를 이용하여 과립물 제조 후 건조기를 이용하여 건조한다.
- (4) 혼합 : 활택제를 넣은 후 혼합한다.
- (5) 타정 : 타정기를 이용하여 일정량을 타정한다.
- (6) 코팅 : 코팅기를 이용하여 일정량을 코팅한다.
- (7) 선별 : 불량한 정제를 선별한다.
- (8) 포장방법 : 신고된 포장재질에 적합한 포장방법 및 포장단위로 포장한다.
- (9) 검사 : 건강기능식품 규격에 따라 검사를 실시한다.
- (10) 출고 : 포장상태의 이상 유무를 확인하여 규격에 적합한 제품에 한하여 출하한다.

## 야관문 재배체계 구축

### \* 야관문의 재배 환경



[10, 11월 야관문 재배사진]

- 산록 아래에서 흔히 자라며 키는 1미터에 이르며 가지는 가늘고 짧으며 털이 있고 곧게 서며 밑부분은 검자주색을 띠기도 한다. 잎은 3출엽이며 어긋나는데 줄기에 촘촘히 달린다.
- 꽃은 8~9월에 피며 흰색이고 잎보다 짧으며 잎겨드랑이에 몇 개씩 모여 달린다.
- 산기슭 이하에서 자라며 줄기는 곧게 서고 가늘고 짧은 가지는 능선과 더불어 털이 있다. 높이 50~100cm까지 자라며 가지가 많다.

### \* 야관문 지역, 시기별 지표성분 함량

구분	시료1	시료2	시료3	시료4	시료5	시료6	시료7	시료8
채취시기	10월	10월	11월	11월	11월	11월	11월	11월
채취지역	인제	인제	인제	인제	보은	보은	곡성	곡성
비 텍 신 (vitexin) (mg/g)	4.14	4.54	2.94	3.11	0.57	0.75	2.03	1.81

\* 결론

- 야관문은 뚝방길, 양지바른 습한 곳, 물가에서 잘 자란다.
- 채취시기, 채취지역별로 크기, 길이 등에 차이가 있으며 비텍신 함량에도 차이가 있다. 채취시기는 10월에 채취한 것이 11월에 채취한 것보다 비텍신 함량이 더 높으며 채취지역은 보은, 곡성보다 인제에서 채취한 비텍신 함량이 더 높다.
- 꽃이 활짝 피는 8월-9월 시기 야관문이 약용이 제일 좋다고 한다.  
→ 과제가 9월에 시작되어 꽃 활짝 핀 야관문은 올해 채취 후 지표성분 정량 후 재배체계 확립 예정

\* 원료수급

- 인제에서 최대 물량을 채취하고 밭에 계약 재배 예정
- 보은 지역에서도 계약재배 검토

<1협동기관 : 단국대학교병원>

1. 샘플

- 음성 대조군
- 양성 대조군: 비아그라, 마카, 민들레 가루, 야관문 샘플 총 6종  
현재 야관문 샘플은 계절별 샘플 2 종을 제외하고 모두 수령이 된 상태임.



그림 1. 실험에 사용된 야관문 추출물 및 양성 대조군

## 2. 시험관적 독성실험

· 세포주는 ATCC에서 구매한 Primary Umbilical Vein Endothelial Cells; Normal, Human (HUVEC) (ATCC® PCS-100-010™)을 사용하였음.

· 세포들은 96-well 플레이트에  $1 \times 10^4$ 으로 분주하여 24 시간 배양시키고 분화를 유도시킨 다음 멜라토닌을 농도별로 가하고 다시 24 시간 동안 배양하여 세포에 대한 독성을 측정하였음.

· MTT를 각 well당 첨가하고 3시간 배양 후 lysis solution을 가하여 microplate reader (Molecular Devices Co.) 450 nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교하여 세포의 생존율을 계산하였음.

· 계산결과 야관문 추출물의 독성은 500ug/mL 까지 없는 것으로 나타남.

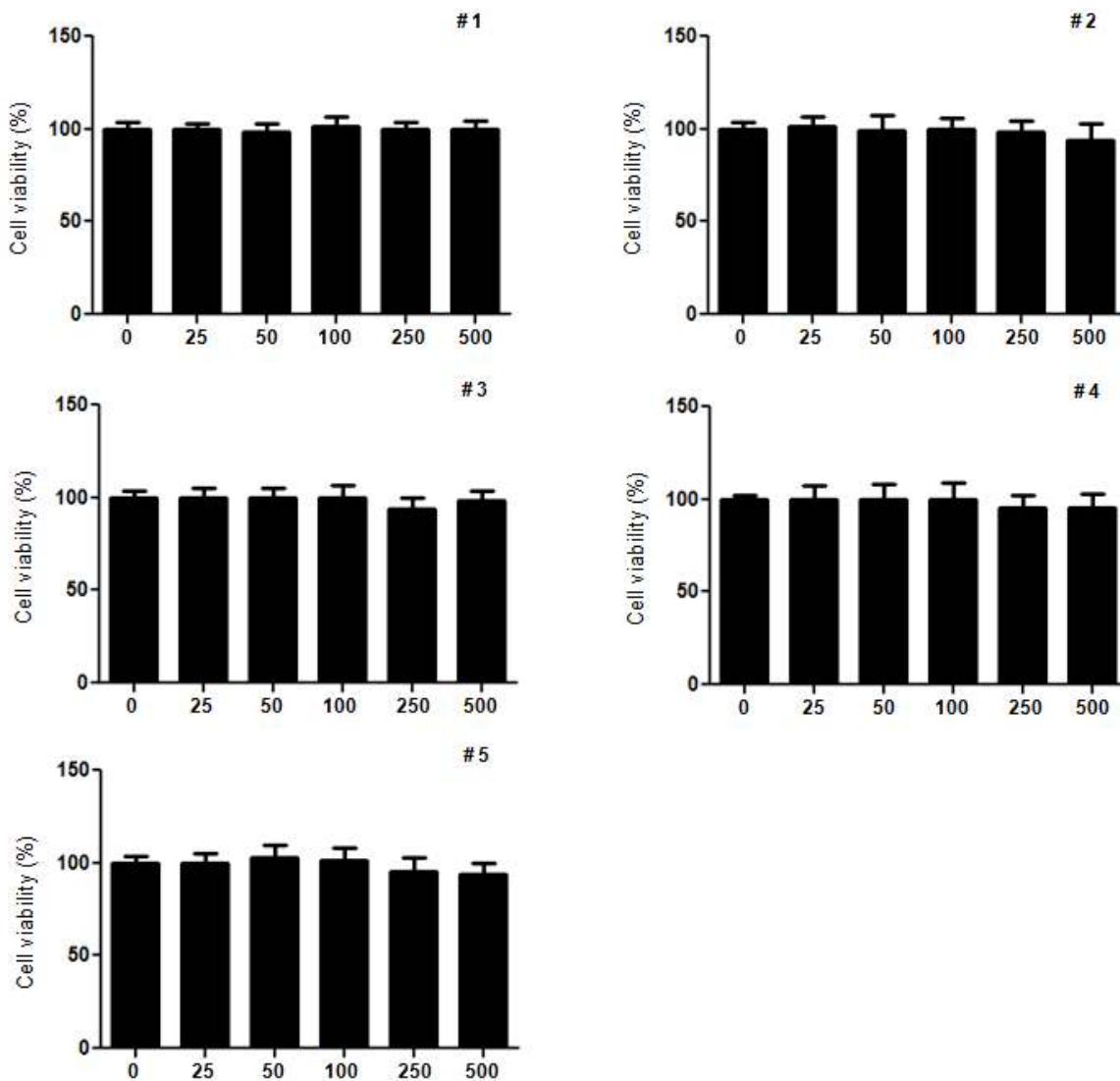


그림 2. 야관문 추출물에 대한 in vitro 독성실험 결과

## 3. 실험동물 및 비임상시험

일정한 온도와 습도가 유지되는 조건에서 사육된 체중 320g 이상, 10 주령의 건강한 음성 Sprague Dawley 계 흰 쥐를 사용하며 대조군 7마리, 그룹 당 10 마리를 설정하고 야관문 검액은 30일 동안 매일 1회, 총 30 회 구강 투여하였음.



**동물실험계획 승인신청서**

1. 일반사항

심의번호: **16-031**

과 제 명	(국 문) 야관문 추출분말의 남성 갱년기 관련 증상 개선 효능 검증
	(영 문) Development of vasolidator functional food using Lespedeza Cuneata
실험 기간	위원회 승인 일 이후 ~ 2016 년 8 월 31 일 (총 5 주/개월)
실험구분	<input checked="" type="checkbox"/> 신규 <input type="checkbox"/> 계속 (구 계획서 승인번호: )
연구비관련	<input type="checkbox"/> 국책과제 <input checked="" type="checkbox"/> 산업체 연구비 <input type="checkbox"/> 기관 자체연구비 <input type="checkbox"/> 기타 연구비 <input type="checkbox"/> 해당없음

연구책임자	성 명	이연희	소 속	BLIK	직 위	연구전임강사
	연락처		휴대폰		E-mail	
	전공/학위	병리학/박사	교육이수	<input checked="" type="checkbox"/> 기관자체교육 (일자:4/14,이수번호:DKU-2015-075)		
동물실험수행자 (1)	성 명	최순향	소 속	BLIK	직 위	연구원
	연락처		휴대폰		E-mail	
	전공/학위	임상병리/학사	교육이수	<input checked="" type="checkbox"/> 기관자체교육 (일자:4/14,이수번호:DKU-2015-084)		
동물실험수행자 (2)	성 명	김은영	소 속	BLIK	직 위	연구원
	연락처		휴대폰		E-mail	
	전공/학위	의학/석사	교육이수	<input checked="" type="checkbox"/> 기관자체교육 (일자:4/14,이수번호:DKU-2016-013)		

실험동물	동물종류	<input type="checkbox"/> 마우스 <input checked="" type="checkbox"/> 랫드	미생물학적 등급	<input type="checkbox"/> SPF <input checked="" type="checkbox"/> 준SPF(Clean) <input type="checkbox"/> 일반(Conv.) <input type="checkbox"/> 기타( )
		<input type="checkbox"/> 토끼 <input type="checkbox"/> 기니피그 기타 ( )	사육 희망 장소	<input type="checkbox"/> barrier구역 <input type="checkbox"/> Semi-barrier구역 <input checked="" type="checkbox"/> 일반구역(장소 : 의과대학 동물실)
	계 통	SD	반 입 예 정 일	년 월 일
	성별/수량	♂: 25 ♀:	동 물 구 입 처	나라바이오 ※식품의약품안전청에 등록된 실험동물공급업체이어야 합니다.
체중/주령	200 gram/ 5 주령			

**생물학적 위해물질의 사용 여부 및 병원체 (생물학적 위해물질 사용 시 식약청에 사전 보고할 것)**

사용하지 않음

<input type="checkbox"/> 사용함	위험군 분류	<input type="checkbox"/> 제3위험군(병원체: ) <input type="checkbox"/> 제4위험군(병원체: ) ※ 「생명공학육성법」 제15조 및 같은 법 시행령 제15조에 따라 보건복지부장관이 작성한 실험지침에 따름
	병원체 분류	<input type="checkbox"/> 제1군전염병(병원체: ) <input type="checkbox"/> 제2군전염병(병원체: ) <input type="checkbox"/> 제3군전염병(병원체: ) ※ 「전염병예방법」 제2조에 따름

## 2. 연구 및 실험개요

### 1. 연구목적 (비전문가도 이해할 수 있도록 평이하게 기술)

갱년기란 성 호르몬 (sex hormone)의 감소로 여러 증상이 나타나는 기간을 의미한다. 갱년기는 주로 중년 여성에게 나타나는 것으로 알고 있지만 30대 후반부터 성호르몬 분비가 서서히 감소하는 남성에게도 갱년기 증상이 나타나게 된다. 테스토스테론 (Testosterone)은 주로 남성의 고환에서 생산되며 남성의 신체 건강·정신 상태 등을 조절하고 남성다움과 성생활에 주도적인 역할을 한다. 30대 전후부터 해마다 약 1%씩 감소하여 50~70대 남성의 약 30~50%에서 남성호르몬이 정상치보다 감소되어 있다. 하지만 남성의 경우 여성과는 달리 생식 능력이 떨어지기는 하지만 완전히 소멸되는 것은 아니기 때문에 생식 능력의 소실을 의미하는 것은 아니며 갱년기 증상에 있어 개인차가 크게 난다.

Lespedeza Cuneata 는 콩과 싸리속에 속하는 여러 해살이 식물로 우리나라 이름으로는 비수리라고 불리운다. 남성의 갱년기의 혈액 순환에 도움을 주어 남성 호르몬의 변화를 보고자하여 실험 동물 모델을 이용 함으로 독성평가 및 남성 호르몬 혈관기능 평가를 함으로 남성 갱년기 개선의 대체 약물로서의 가능성을 확인하고자 한다.

### 2. 동물실험의 필요성 및 기대효과

사람에게 적용하기 위해서는 동물모델을 이용한 전 임상실험이 반드시 선행되어야 한다.

따라서 본 실험결과를 확인하기 위해서는 동물실험을 통한 비교분석이 필수적이며 이 연구는 국내 약물작물인 Lespedeza Cuneata 추출물이 남성 갱년기 개선에 도움이 되고 향후 임상 실험을 위한 중요한 자료가 될 것으로 사료된다.

### 3. 동물실험을 대체할 수 있는 방법의 유무

■ 검토하였으나, 동물실험을 대체할 수 있는 방법이 없었다.

□ 검토하였으나, 대체수단으로는 연구목적을 충분히 달성하기가 어려웠다.

검색사이트 ■ PubMed □ Current Contents Connect □ 한국학술정보 □ 기타 ( )

Key words Lespedeza Cuneata, Testosterone

### 4. 해당 동물(animal)과 종(strain)을 선택한 합리적 이유(연구의 생물학적 연관성 제시)

실험에 사용되는 rat은 광범위하게 사용되며, 영양이나 대사 생리적 측면에서 다른 종류의 동물보다 사람과의 유사성이 높고 장기의 중량비가 사람과 비슷하다. 몸집이 커서 시료채취에도 더 많은 양을 얻을 수 있기 때문에 rat을 사용한다.

### 5. 사용 동물 수에 대한 합리적 근거 (가능하면 동물수를 산출한 통계적 근거를 제시)

실험의 진행에 있어서 통계학적으로 유의성이 있는 최소한의 개체 수로 1회만 실시한다. In vivo study- 대조군, 실험군(저농도, 고농도) 총 3 그룹으로 나누어 실험한다. 대조군 5마리, 실험군 고농도 10마리, 저농도 10마리로 통계학적으로 유의성이 필요한 최소한의 개체수로 산정한다.

**6. 실험방법 (프로토콜) 개요 (필요시 별지를 사용하여 구체적으로 기술할 것)**

동물은 각각 대조군과 실험군(저농도,고농도)으로 나누어 총 3군으로 한다.

대조군은 5마리 실험군 각 5마리씩 총 15마리로 한다.

① 대조군 - 5마리(아무것도 처리하지 않은 군)

② 실험군 - 저농도100 mg/Kg 5마리

- 고농도250 mg/Kg 5마리

4주 동안 주 3회 *Lespedeza Cuneata* 추출물을 존대를 이용하여 구강투여하고 체중을 측정한다.

4주 후 실험 종료한다.

**효과관찰**

4주 후 실험이 끝나면 Medetomidine hydrochloride를 1 : 3 비율로 희석시킨 다음 약 150ul/200-250g 으로 혈액 내 투여하여 마취 후 혈액 채취 후 동물들을 CO<sub>2</sub> 가스로 안락사 시키고, 비장과 고환을 적출한다. 비장은 무게 측정 및 표면과 상태 등의 육안 평가를 한다. 고환은 한쪽은 동결하고 다른 한쪽은 포르말린에 고정한다.

-혈액 생화학 분석(유효성 평가)

혈청으로는 GOT, GPT, BUN, 테스토스테론 측정

-조직학적 분석

고환은 포르말린용액에 고정한 후, 고환 절편을 취하여 탈수시킨 후 파라핀 블록에 포매한다. 조직은 조직 절편기를 이용하여 5 $\mu$ m로 절단한 다음으로 코팅된 슬라이드에 붙여 파라핀 제거 및 함수과정을 거친 후 Hematoxylin-Eosin(H&E) 염색을 실시한다.

※ 복수의 대규모 수술실험을 시행하는 경우, 그 필요 사유 (단 원칙적으로 불허함)

**7. 특별한 주거(Housing) 및 사육조건 필요 유무**

해당사항 없음

**8. 동물이 경험하는 통증 및 스트레스의 정도 (해당사항에 V표)**

고통등급 A : 원생동물, 무척추동물을 사용하는 실험

고통등급 B; 척추동물을 사용하지만 거의 고통을 주지 않는 실험

고통등급 C; 척추동물에게 약간의 스트레스 혹은 단기간의 작은 통증을 주는 실험

고통등급 D; 척추동물에게 회피 할 수 없는 스트레스 혹은 통증을 주는 실험(진정제, 진통제, 마취제 등을 사용)

고통등급 E; 척추동물에게 회피 할 수 없는 스트레스 혹은 통증을 주는 실험(진정제, 진통제, 마취제 등을 사용할 경우 실험 결과에 부정적인 영향을 주는 실험 등)

※ 고통등급 E에 해당되는 동물실험은 원칙적으로 불허하나, 불가피한 동물실험은 9번 사유 기재

**9. 고통등급 D에 해당되는 동물실험에서 동물의 통증 혹은 스트레스 경감을 위한 방법**

<input checked="" type="checkbox"/>	마취제 · 진통제 등을 사용 : Medetomidine hydrochloride를 1 : 3 비율로 희석시킨 다음 약 150ul/ 200-250g 으로 혈액 내 투여한다.
<input type="checkbox"/>	기타 : (사육환경 개선 등의 구체적인 내용을 기입)

**10. 고통등급 E에 해당되는 동물실험을 수행하는 사유 (필요 시, 별지로 상세 사유 첨부)**

<input type="checkbox"/>	인도적 종료시점은 채택하지만, 연구목적 상 진정 · 진통제를 투여할 수 없거나, 고통경감을 위한 방법 없음
<input type="checkbox"/>	(상세 사유 기재) 예) 통증실험 수행으로 진통제를 사용하면 연구결과에 영향을 미침
<input type="checkbox"/>	연구목적 상 인도적 종료시점을 채택하지 않고 동물의 죽음을 종료시점으로 설정해야 함.
<input type="checkbox"/>	(상세 사유 기재) 예) LD50 측정을 위한 독성실험

**11. 윤리적 측면에서의 인도적인 종료시점(humane endpoint) 기준**

매 실험 전 체중을 체크하여 원 체중의 20%이상 체중의 감소가 있을 경우와, 심한 호흡부전을 보일 경우 안락사를 시킬 예정이다.

**12. 안락사 방법**

약제 ( 사용약물 : \_\_\_\_\_ )     CO<sub>2</sub> 가스     경추탈골

기타 ( \_\_\_\_\_ )

※ 사체처리방법 (보관 장소 및 사체 처리업체명)

**13. 실험자를 위한 작업환경의 안전성 확보 여부**

- 본 시험의 시험물질 취급시 주의사항과 유해정도를 알려 주었다
- 실험자가 유해상황에 따라 적절한 보호장비를 지급받고 있다
- 동물로부터 찰과상, 교상, 알레르기에 대비한 구급의약품을 갖추고 있다
- 실험자가 사육하는 동물의 인수공통전염병에 대해 숙지하고 있다
- 실험자가 폐기물 취급, 개인위생, 유해물질에 대해서도 숙지하고 있다

14. 연구비 관련 사항			
지원 기관	(주) 에스에프씨 기능성 의약임상지원 센터		
연구 과제명	야관문 추출분말의 남성 갱년기 관련 증상 개선 효능 검증 용역연구		
연구 기간	2016.07.01.-2016.11.31		
연구과제 책임자	이연희	연구비 금액	10,000천원

본 연구수행을 위하여

1. 실험동물의 윤리적 사용과 3R원칙에 따라 동물실험의 수행에 대하여 충분히 검토하였습니다.
2. 「동물보호법」과 실험동물에 관한법률에 규정된 사항을 준수하며, 단국대학교 동물실험지침을 준수하겠습니다.
3. 과제 승인 기간은 최대 1년임을 확인하였으며, 1년이 초과할 경우 재승인 하겠습니다. 또한 승인된 계획을 변경할 경우 동물실험계획변경신청서를 통해 위원회에 알리고 승인을 받겠습니다.
4. 연구책임자로서 본인을 포함한 등록된 실험수행자들이 실험동물의 윤리적 사용과 승인된 동물실험 방법을 준수하도록 책임·지도하겠습니다.
5. 위 사항의 이행과 함께 위원회 및 동물실험시설장의 결정에 적극 협조하고 따를 것을 서약하며 본 동물실험계획 승인신청서를 제출합니다.

2016년 6월 24일

연구책임자 이 연 희 (인)

## 동물실험계획 승인서

### 1. 연구책임자

성명	소속	직급	연락처	교육이수내용
이연희	BLIK	연구전임강사		DKU-2015-075

### 2. 동물실험계획서

접수번호	16-031
과제명	(국문) 야관본 추출분말의 남성 갱년기 관련 증상 개선 효능 검증
	(영문) Development of vasolidator functional food using Lespedeza Cuneata
실험기간	위원회 승인 일 이후 ~ 2016년 8월 31일 (총 5주)
사용 동물 종 및 마리 수	랫드 ♀ 16
동물이 경험하는 통증 및 스트레스의 정도	Grade C

### 3. 승인 사항

심의일자	2016.08.09
승인일자	2016.08.19
승인번호	DKU-16-031
심의위원 의견	지적사항 없음

단국대학교 실험동물운영위원회에서는 상기의 동물실험계획을 승인합니다.

2016년 8월 19일

단국대학교 실험동물운영위원회 위원장



## 1) 유효성 평가



그림 3. 야관문 추출물 투여 및 혈액 샘플 채취

희생 전 24시간부터 물을 제외한 모든 섭식을 중단하고 희생 당일 Medetomidine hydrochloride: rompun 희석액을 100ul/마리씩 투여하여 가볍게 마취한 다음 하복부를 절개하여 복부 대동맥으로부터 5cc 채혈하고 음경해면체와 고환을 적출하였음. 적출한 음경해면체와 고환을 생리식염수로 깨끗하게 세척한 후, 남아있는 이물질 및 혈액을 여지로 제거하고 동결하였음. 혈액은 EDTA 처리한 후 혈장을 분리하여 동결하였음.

동결한 혈장은 다음의 생화학 검사를 시행할 예정임.

- 간독성검사(GOT/GPT),
- 신장독성 검사 (BUN),
- 알칼리성 인산 가수분해 효소 (Alkaline phosphatase, ALP)
- 젖산 탈수소 효소 (lactate dehydrogenase, LDH)
- 감마 글루타미드 전이효소 (gamma-glutamyl transpeptidase, r-GT)

동결 음경해면체 조직과 혈장은 각각 성기능 검사와 혈관기능 검사, 지질대사기능 및 당대사 기능평가에 사용할 예정임.

### ① 성기능 평가

- free testosterone
- SHBG (Sexual hormone binding globulin)
- 17-beta HSD

### ② 혈관확장 및 산화질소 평가

- nNOS
- cGMP
- Prostaglandin E2 (PGE<sub>2</sub>)

### ③ 지질대사기능 및 당대사 기능평가

- Total cholesterol

- LDL-C
- HDL-C
- triglyceride

2) 안전성 평가

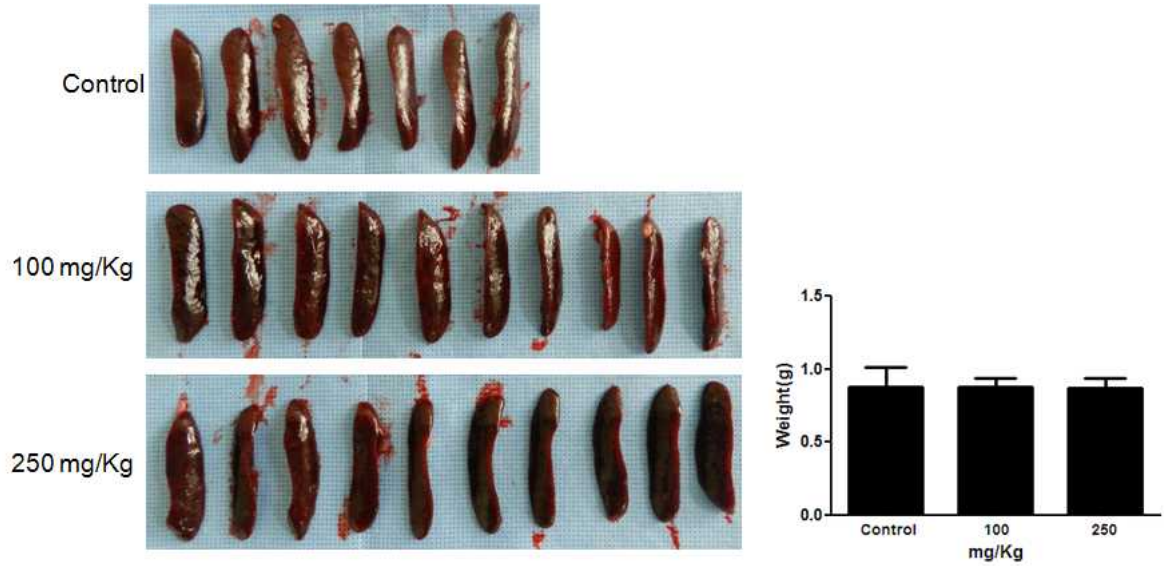


그림 4. 야관문 섭취군과 대조군의 비장 모습

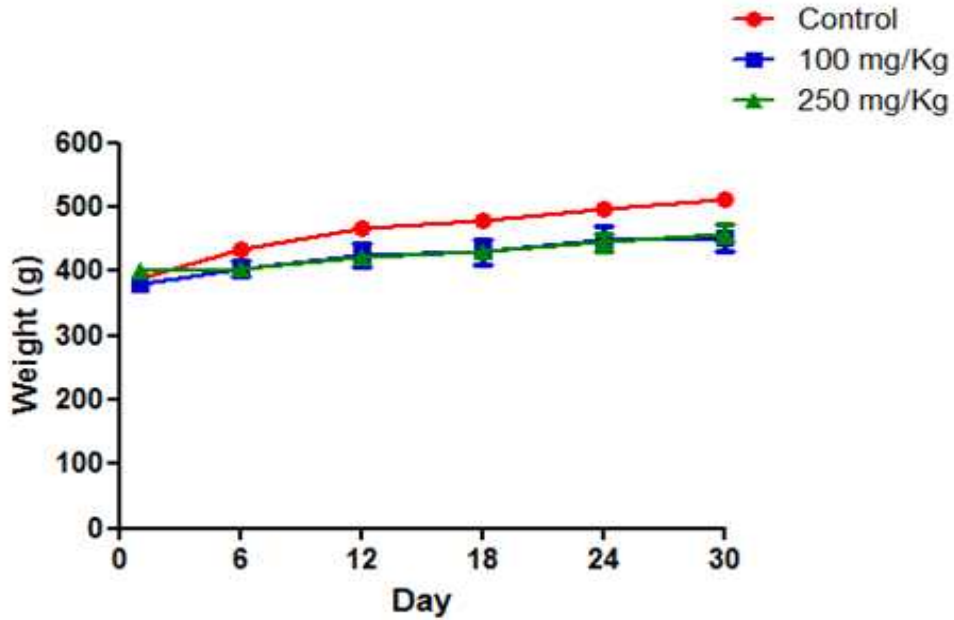


그림 5. 야관문 섭취군과 대조군의 몸무게 변화 추이



야관문 섭취군과 대조군간 비장의 무게나 색, 부피 변화는 발견되지 않았다 (그림 4). 대조군과 섭취군 간의 총 몸무게 변화가 관찰되어 총 무게 감소에 대한 유의성을 검사한 결과 대조군-섭취군 간의 몸무게 감소에는 상관관계가 없었고 간조직 검사와 간기능 검사를 실시한 결과 간경변이나 독성에 의한 간조직 변화는 발견되지 않았음.

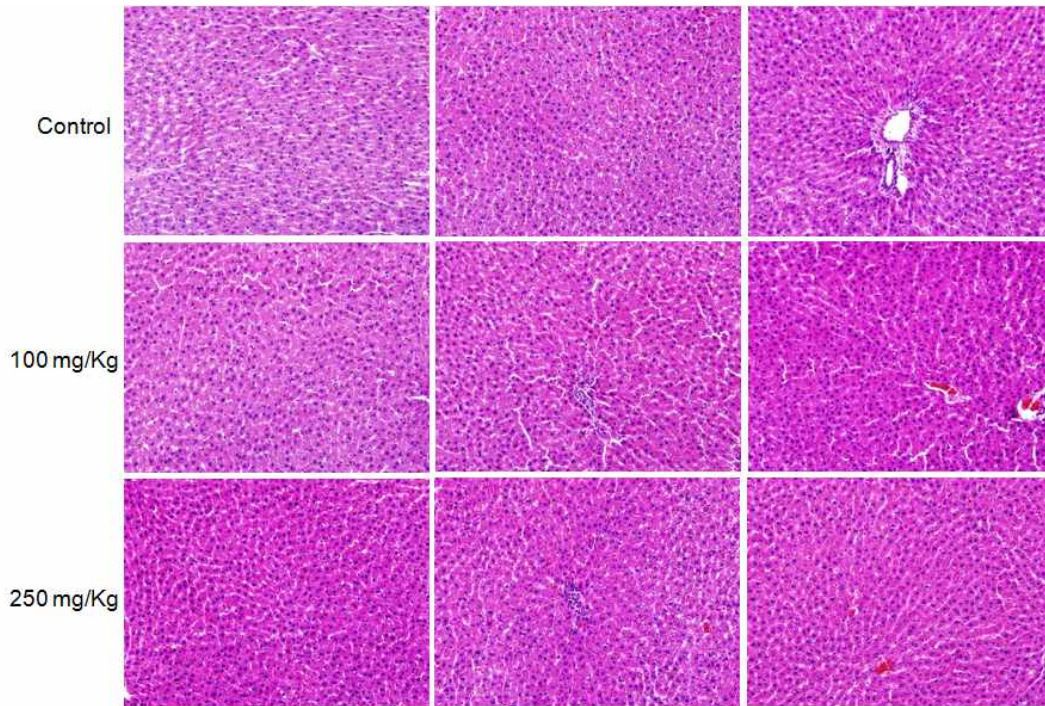


그림 6. 야관문 섭취군과 대조군의 간 조직 관찰사진

#### 4. 기타

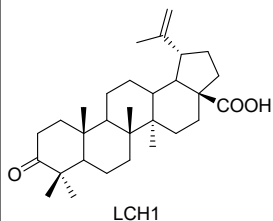
- 기존의 실험방법과 동일한 저농도 (100mg/Kg), 고농도 (250mg/Kg) 두 군으로 섭식시키는 방법을 사용하였음.
- 비아그라는 사용법 (50mg/Kg) 에 준하여 섭식시켰음.
- 마카, 민들레분말의 사용농도는 따로 설정되지 않아 100mg/Kg를 적용할 계획임.
- 곡성, 보은 지역의 10월 채취 샘플이 확보되지 않아 2종의 샘플을 확보하는 대로 마카, 민들레 분말과 같이 실험할 예정임.

<2협동기관 : 중앙대학교>

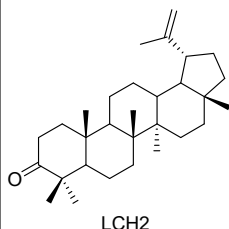
#### 1) 성분분리 및 구조규명

Betulonic acid (LCH1): ESI-MS  $m/z$  455.4  $[M+H]^+$ ,  $^1H$ -NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  4.74 and 4.61 (each 1H, br s, H-29), 1.69 (3H, s, H-30), 1.44 (3H, s, H-25), 1.08 (3H, s, H-27), 1.01 (3H, s, H-24), 0.99 (3H, s,

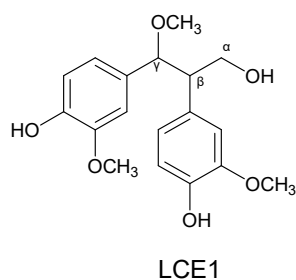
H-23), 0.97 (3H, s, H-26);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  218.7 (C-3), 182.1 (C-28), 150.9 (C-20), 110.4 (C-29), 57.0 (C-17), 55.6 (C-5), 50.5 (C-9), 49.9 (C-18), 48.0 (C-4), 47.5 (C-19), 43.2 (C-14), 41.3 (C-8), 40.3 (C-1), 39.2 (C-13), 37.7 (C-10), 37.6 (C-22), 34.8 (C-2), 34.3 (C-7), 32.8 (C-16), 31.2 (C-15), 30.3 (C-21), 27.3 (C-23), 26.2 (C-12), 22.0 (C-11), 21.6 (C-24), 20.3 (C-6), 20.0 (C-30), 16.6 (C-25), 16.5 (C-26), 15.3 (C-27).



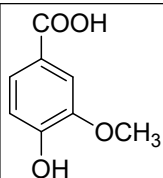
Lupenone (**LCH2**): ESI-MS  $m/z$  425.3  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  4.70 (1H, br s, H-29a), 4.58 (1H, br s, H-29b), 1.68 (3H, brs, H-30), 1.07 (6H, s, H-24 and H-26), 1.03 (3H, s, H-23), 0.96 (3H, s, H-27), 0.93 (3H, s, H-25), 0.80 (3H, s, H-28);  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  218.1 (C-3), 150.8 (C-20), 109.4 (C-29), 60.4, 54.9, 49.8, 48.2, 47.9, 47.3, 42.8, 40.8, 40.0, 39.6, 38.2, 36.9, 35.5, 34.1, 33.6, 29.7, 27.4, 26.6, 25.1, 21.5, 21.0, 19.7, 19.3, 18.0, 15.8, 14.5, 14.2.



Benzenepropanol (**LCE1**): ESI-MS  $m/z$  357.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ,  $^1\text{H-NMR}$  (800 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  3.87, 4.15 (each 1H, m, H- $\alpha$ ), 3.03 (1H, m, H- $\beta$ ), 4.31 (1H, d,  $J = 9.3$  Hz, H- $\gamma$ ), 6.32-6.74 (6H, m, ArH), 5.52, 5.54 (each 1H, br s,  $2 \times \text{OH}$ ), 3.77(3H, s, OMe), 3.72 (3H, s, OMe), 3.26 (3H, s,  $\gamma$ -OMe);  $^{13}\text{C-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  666.8 (C- $\alpha$ ), 54.9 (C- $\beta$ ), 89.5 (C- $\gamma$ ), 131.2, 131.8 (C-1, C-1'), 109.4, 111.6, 113.8, 114.2 (C-2, C-2', C-5, C-5'), 146.2, 146.3 (C-3, C-3'), 144.3, 145.0 (C-4, C-4'), 120.6, 120.7 (C-6, C-6'), 55.9 (3'-OMe), 56.6 ( $\gamma$ -OMe).

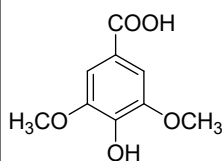


Vanillic acid (**LCE3**): ESI-MS  $m/z$  169.1  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ,  $^1\text{H-NMR}$  (800 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7.57 (1H, d,  $J = 1.8$  Hz, H-2), 7.46 (1H, dd,  $J = 8.1, 1.8$  Hz, H-6), 6.73 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5), 3.87 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  170.6 (C-7), 151.8 (C-3), 148.1 (C-4), 125.0 (C-1), 124.2 (C-6), 115.1 (C-2), 114.0 (C-5), 56.3 ( $-\text{OCH}_3$ ).



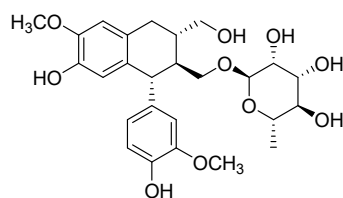
LCE3

Syringate (**LCE4,5**): ESI-MS  $m/z$  199.1  $[M+H]^+$ ,  $^1H$ -NMR (800 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  3.82 (6H, s,  $-OCH_3$ ) 7.33 (2H, s, H-2,6);  $^{13}C$ -NMR (200 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  56.73 ( $-OCH_3$ ), 108.24 (C-3,5), 121.87 (C-4), 141.67 (C-1), 148.79 (C-2,6), 169.93 (COOH).



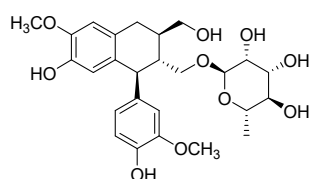
LCE4  
=LCE5

(-)-(8*S*,7'*R*,8'*S*)-isolariciresinol-9'-*O*- $\alpha$ -*L*-rhamnoside (**LCE8**): ESI-MS  $m/z$  529.2  $[M+Na]^+$ , for  $^1H$ -NMR (800 MHz,  $CD_3OD$ ) and  $^{13}C$ -NMR (200 MHz,  $CD_3OD$ ) spectroscopic data, see Table 1.



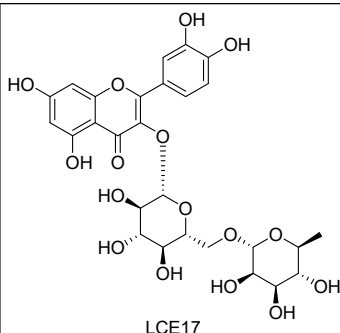
LCE8 (-)

Aviculin (**LCE9**): ESI-MS  $m/z$  529.3  $[M+Na]^+$ , for  $^1H$ -NMR (800 MHz,  $CD_3OD$ ) and  $^{13}C$ -NMR (200 MHz,  $CD_3OD$ ) spectroscopic data, see Table 1.

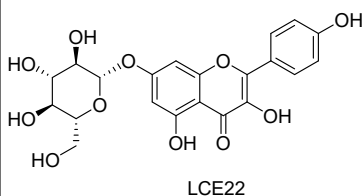


LCE9 (+)

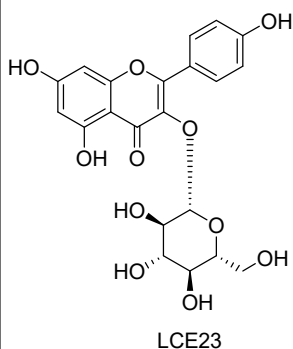
Rutin (**LCE17**): ESI-MS  $m/z$  633.1  $[M+Na]^+$ ,  $^1H$ -NMR (800 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  7.66 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-2'), 7.62 (1H, dd,  $J$  = 8.4 Hz, 2.0 Hz, H-6'), 6.86 (1H, d,  $J$  = 8.4 Hz, H-5'), 6.37 (1H, d,  $J$  = 2.2 Hz, H-8), 6.19 (1H, d,  $J$  = 2.2 Hz, H-6), 5.08 (1H, d,  $J$  = 7.6 Hz, H-1''), 4.52 (1H, d,  $J$  = 1.2 Hz, H-1'''), 3.25~3.81 (10H, m, H-2'', 2''', 3'', 3''', 4'', 4''', 5'', 5''', 6''), 1.12 (3H, d,  $J$  = 6.0 Hz, H-6'''),  $^{13}C$ -NMR (200 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  179.5 (C-4), 165.7 (C-7), 162.6 (C-5), 159.1 (C-9), 158.2 (C-2), 149.6 (C-4'), 145.6 (C-3'), 135.5 (C-3), 123.4 (C-1'), 122.9 (C-6'), 117.6 (C-5'), 115.9 (C-2'), 105.5 (C-10), 104.7 (C-1''), 102.2 (C-1'''), 99.8 (C-6), 94.8 (C-8), 78.0 (C-5''), 77.0 (C-5'''), 75.6 (C-2''), 73.8 (C-4''), 72.1 (C-3'''), 72.0 (C-2'''), 71.2 (C-4'''), 69.6 (C-5'''), 68.5 (C-6'''), 17.9 (C-6''').



Populin (**LCE22**): ESI-MS  $m/z$  471.2  $[M+Na]^+$ ,  $^1H$ -NMR (800 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  12.85 (1H, s, 5-OH), 7.96 (2H, d,  $J$  = 8.8 Hz, H-2',6'), 6.81 (1H, d,  $J$  = 1.7 Hz, H-8), 6.80 (2H, d,  $J$  = 8.8 Hz, H-3',5'), 6.44 (1H, d,  $J$  = 1.7 Hz, H-6), 5.50 (1H, d,  $J$  = 7.6 Hz, H-1''), 3.30~3.65 (5H, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6''),  $^{13}C$ -NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  176.1 (C-4), 160.4 (C-5), 159.4 (C-4'), 157.9 (C-7), 155.8 (C-9), 147.5 (C-2), 136.1 (C-3), 130.5 (C-2',6'), 121.5 (C-1'), 116.2 (C-5'), 104.7 (C-10), 103.0 (C-6), 98.0 (C-8), 96.9 (C-1''), 77.2 (C-5''), 76.4 (C-3''), 73.1 (C-2''), 69.6 (C-4''), 60.6 (C-6'').

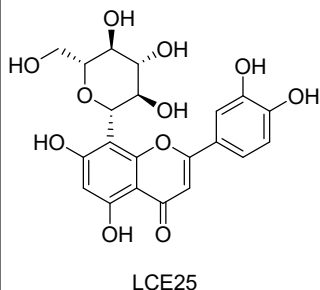


Astragalin (**LCE23**): ESI-MS  $m/z$  471.2  $[M+Na]^+$ ,  $^1H$ -NMR (800 MHz, CD $_3$ OD)  $\delta$  8.05 (2H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H-2',6'), 6.88 (2H, d,  $J$  = 9.0 Hz, H-3',5'), 6.39 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-8), 6.20 (1H, d,  $J$  = 2.0 Hz, H-6), 5.24 (1H, d,  $J$  = 7.3 Hz, H-1''), 3.68 (1H, dd,  $J$  = 2.3, 11.9 Hz, H-6''a), 3.52 (1H, dd,  $J$  = 5.4, 11.9 Hz, H-6''b), 3.44 (1H, dd,  $J$  = 7.3, 9.1 Hz, H-2''), 3.41 (1H, t,  $J$  = 9.1 Hz, H-3''), 3.32 (1H, t,  $J$  = 9.1 Hz, H-4''), 3.19 (1H, ddd,  $J$  = 2.3, 5.4, 9.1 Hz, H-5''),  $^{13}C$ -NMR (200 MHz, CD $_3$ OD):  $\delta$  179.5 (C-4), 166.0 (C-7), 163.1 (C-5), 161.6 (C-4'), 159.1 (C-9), 158.5 (C-2), 135.5 (C-3), 132.3 (C-2',6'), 122.8 (C-1'), 116.1 (C-3',5'), 105.8 (C-10), 104.1 (C-1''), 99.9 (C-6), 94.7 (C-8), 78.4 (C-5''), 78.1 (C-3''), 75.7 (C-2''), 71.4 (C-4''), 62.6 (C-6'').

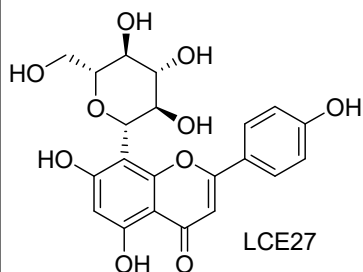


Orientin (**LCE25**): ESI-MS  $m/z$  471.1  $[M+Na]^+$ ,  $^1H$ -NMR (800 MHz, CD $_3$ OD)  $\delta$  7.64 (1H, br s, H-2'), 7.60 (1H, br d,  $J$  = 8.2 Hz, H-6'), 6.99 (1H, d,  $J$  = 8.2 Hz, H-5'), 6.62 (1H, s, H-3), 6.36 (1H, s, H-6), 5.07 (1H, d,  $J$  = 9.7 Hz, H-1''), 4.20 (1H, t,  $J$  = 9.5 Hz, H-2''), 4.06 (1H, m, H-6''a), 3.94 (1H, dd,  $J$  = 5.3, 12.0 Hz, H-6''b), 3.78 (1H, t,  $J$  = 9.2 Hz, H-4''), 3.62 (1H, m, H-3''), 3.56 (1H, m, H-5''),  $^{13}C$ -NMR (200

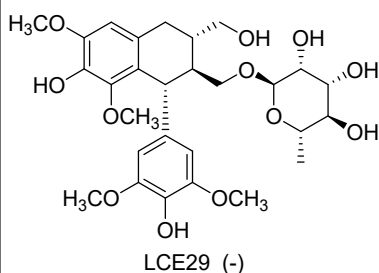
MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  184.2 (C-4), 166.7 (C-2), 164.6 (C-7), 162.7 (C-5), 158.1 (C-9), 150.9 (C-4'), 147.1 (C-3'), 124.1 (C-1'), 120.9 (C-6'), 116.7 (C-5'), 115.0 (C-2'), 105.9 (C-8), 105.2 (C-10), 103.7 (C-3), 99.4 (C-6), 82.9 (C-5''), 80.3 (C-3''), 75.4 (C-1''), 72.9 (C-2''), 70.3 (C-4''), 63.2 (C-6'').



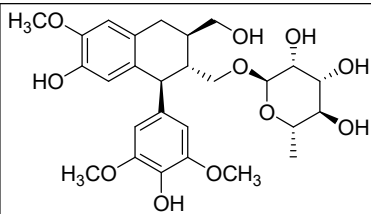
Vitexin (**LCE27**): ESI-MS  $m/z$  471.2 [M+Na]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (800 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.01 (2H, d,  $J$  = 8.6 Hz, H-2',6'), 6.88 (2H, d,  $J$  = 8.6 Hz, H-3',5'), 6.77 (1H, s, H-3), 6.26 (1H, s, H-6), 4.67 (1H, d,  $J$  = 9.8 Hz, H-1''), 3.82 (1H, t,  $J$  = 9.6 Hz, H-2''), 3.75 (1H, dd,  $J$  = 1.4, 11.6 Hz, H-6''a), 3.51 (1H, dd,  $J$  = 6.7, 11.6 Hz, H-6''b), 3.37 (1H, t,  $J$  = 9.4 Hz, H-4''), 3.24 (1H, m, H-3''), 3.21 (1H, m, H-5''), <sup>13</sup>C-NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):  $\delta$  182.2 (C-4), 164.0 (C-2), 162.6 (C-7), 161.2 (C-4'), 160.5 (C-5), 156.1 (C-9), 129.1 (C-2',6'), 121.7 (C-1'), 115.9 (C-3',5'), 104.7 (C-8), 104.1 (C-10), 102.5 (C-3), 98.2 (C-6), 81.7 (C-5''), 78.7 (C-3''), 73.5 (C-1''), 70.9 (C-2''), 70.3 (C-4''), 61.3 (C-6'').



Lyoniresinol-2a-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (**LCE29**): ESI-MS  $m/z$  589.2 [M+Na]<sup>+</sup>, for <sup>1</sup>H-NMR (800 MHz, CD<sub>3</sub>OD) and <sup>13</sup>C-NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD) spectroscopic data, see Table 1.



(+)-5'-methoxyisolariciresinol-9'-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside (**LCE30**): ESI-MS  $m/z$  559.1 [M+Na]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H-NMR (800 MHz, CD<sub>3</sub>OD) and <sup>13</sup>C-NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD) spectroscopic data, see Table 1.



LCE30 (+)

Table 1.  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compound **8**, **9**, **29**, **30** in  $\text{CD}_3\text{OD}$

Position	<b>8</b>		<b>9</b>		<b>29</b>		<b>30</b>	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1		129.04		129.1		130.3		128.9
2		134.41		138.2		126.2		113.8
3	6.15 s	117.28	6.19 s	117.3		147.7	6.19 s	117.1
4		145.42		146.3		139.0		145.3
5		147.36		149.3		148.8		147.3
6	6.65 s	112.58	6.69 s	112.6	6.58 s	107.8	6.66 s	112.5
7	2.82 d ( $J = 6.7$ Hz)	33.67	2.85 d ( $J = 6.5$ Hz)	33.8	2.82 d ( $J = 6.5$ Hz)	33.7	2.83 d ( $J = 7.8$ Hz)	33.6
8	1.89 m	39.60	2.05 m	40.2	1.63 m	40.8	2.02 m	40.1
9	3.65 dd ( $\text{H}_a\text{-9}, J = 6.5$ Hz, $9.5$ Hz) 3.69 dd ( $\text{H}_b\text{-9}, J = 3.5$ Hz, $11.0$ Hz)	65.53	3.66 m ( $\text{H}_a\text{-9}$ ) 3.76 dd ( $\text{H}_b\text{-9}, J = 3.5\text{Hz}$ )	65.5	3.63 m ( $\text{H}_a\text{-9}$ ) 3.70 m ( $\text{H}_b\text{-9}$ )	66.4	3.62 m, 3.74 m	65.3
1'		138.18		134.2		139.3		137.3
2'	6.66 d ( $J = 1.5$ Hz)	113.87	6.66 d ( $J = 2.0$ Hz)	113.7	6.33 s	106.9	6.39 s	107.5
3'		149.31		147.4		149.1		149.4
4'		146.25		145.4		134.7		135.1
5'	6.75 d ( $J = 8.0$ Hz)	116.17	6.78 d ( $J = 8.0$ Hz)	116.2		149.1		149.4
6'	6.64 dd ( $J = 2.0$ Hz, $8.0$ Hz)	123.57	6.61 dd ( $J = 2.0$ Hz, $8.0$ Hz)	123.3	6.35 s	106.9	6.39 s	107.5
7'	3.86 d ( $J = 11.0$ Hz)	48.61	3.09 m	48.5	4.30 d ( $J = 6.0$ Hz)	43.1	3.86 m	49.6
8'	1.89 m	45.31	2.05 m	46.7	2.07 m	46.7	1.88 m	45.4
9'	3.41 dd ( $\text{H}_a\text{-9}'$ , $J = 3.0$ Hz, $10.0\text{Hz}$ ) 3.54 dd ( $\text{H}_b\text{-9}'$ , $J = 2.5$ Hz, $10.0\text{Hz}$ )	68.02	3.13 dd ( $\text{H}_a\text{-9}'$ , $J = 3.5$ Hz, $10.0$ Hz) 3.85 dd ( $\text{H}_b\text{-9}'$ , $J = 2.5$ Hz, $6.5$ Hz)'	68.1	3.47 m ( $\text{H}_a\text{-9}'$ ) 3.60 m ( $\text{H}_b\text{-9}'$ )	70.2	3.11 dd ( $J = 3.6$ Hz, $10.2$ Hz) 3.82 m	68.0
1''	4.57 d ( $J = 1.5\text{Hz}$ )	102.42	4.53 d ( $J = 1.5$ Hz)	102.5	4.65 d ( $J = 1.0$ Hz)	102.5	4.57 br s	102.3
2''	3.86 m	72.52	3.89 m	72.5	3.88 m	72.4	3.87 m	72.4
3''	3.68 dd ( $J = 3.5$ Hz, $9.5$ Hz)	72.78	3.66 m	72.7	3.68 m	72.5	3.64 m	72.6
4''	3.36 t ( $J = 9.5$ Hz)	74.03	3.37 t ( $J = 9.5$ Hz)	74.0	3.39 m	74.0	3.33 m	73.9
5''	3.58 dd ( $J = 6.5$ Hz, $11.0$ Hz)	70.16	3.54 m	70.3	3.60 m	70.4	3.52 m	70.2
6''	1.18 d ( $J = 6.0$ Hz)	18.04	1.21 d ( $J = 6.0$ Hz)	18.1	1.28 d ( $J = 7.5$ Hz)	18.3	1.18 d ( $J = 6.6$ Hz)	17.9
3-OMe					3.32 s	56.7		

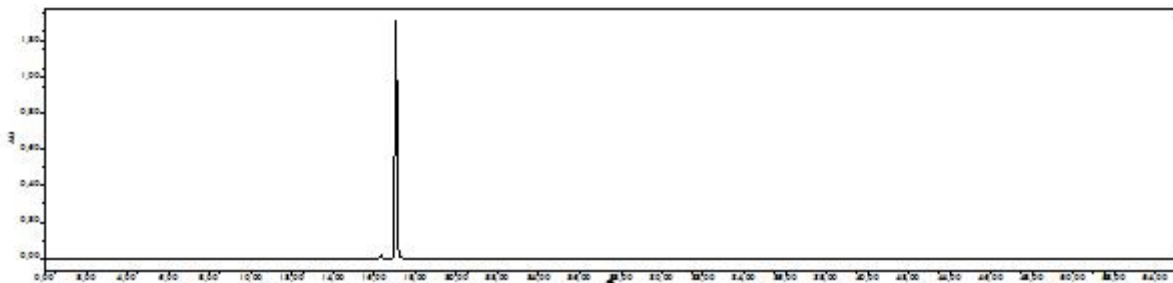
5-OMe	3.78 s	56.52	3.80 s	56.5	3.85 s	60.2	3.81 s	56.4
3' -OMe	3.80 s	56.56	3.83 s	56.5	3.73 s	56.9	3.78 s	56.8
5' -OMe					3.73 s	56.9	3.78 s	56.8

2) 정량분석법 개발

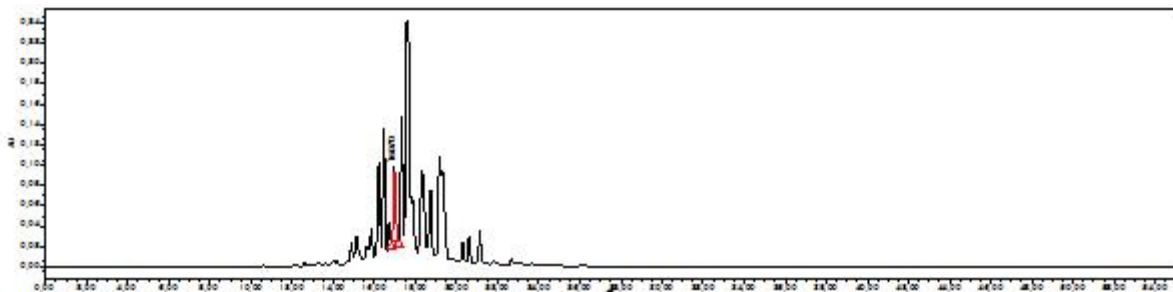
Vitexin의 분석조건

HPLC	Waters 1525 Binary HPLC Pump (Miami, USA) Waters 2489 UV/VIS detector (Miami, USA).			
Column	INNO column C18 (4.6 × 250 mm, 5 μm)			
Wavelength	360 nm			
Flowrate	1 ml/min			
Solvent	A : Water (1% Acetic acid), B : MeOH			
Gradient Condition	Time, min	Flow ,ml/min	A %	B %
	0	1	95	5
	20	1	20	80
	30	1	90	10
	35	1	90	10
	45	1	95	5
	50	1	95	5

Vitexin의 스탠다드 크로마토그램



야관문 추출물의 크로마토그램



○ 평가방법

- 1) 성분분리 및 구조규명: vitexin을 포함하는 야관문의 성분 분리 및 구조동정 여부(80%)
- 2) 정량분석법 개발: vitexin의 분석조건 개발 유무(20%)

2. 2차년도

<주관기관 : (주)네추럴웨이>

1. 야관문 대량생산 공정 확립

3.3. 제조공정표

제조공정	식품/식품첨가물	조건	기능/지표성분 함량변화(%)	수율(kg)
원재료		성상 : 줄기, 잎 식품의 기준 및 규격에 적합한 원료를 사용한다(중금속, 잔류농약)		100%
↓				
인고 및 보관				100%
↓				
정량	비수리, 정제수	비수리(줄기, 잎)		100%
↓				
원료투입	비수리, 정제수	비수리(줄기, 잎) 정제수 : 9~10배수(원물대비)		100%
↓				
1차 추출		온도 : 90~100℃(95℃) 시간 : 12±1시간	2.5brix isovitexin 0.00125% isovitexin 0.0125mg/g	18%
↓				
여과		필터 : 1-10µm이하		
↓				
저장				
↓				
2차 추출	정제수	정제수 : 4~5배수(원물대비) 온도 : 90~100℃(95℃) 시간 : 5±1시간	isovitexin 0.0625% isovitexin : 0.625mg/g	
↓				
여과		필터 : 1-10µm이하		
↓				
농축		온도 : 70±10℃ 고형분 : 20±10brix	10brix isovitexin 0.005% isovitexin : 0.05mg/g	18%
↓				
배합 및 삼균	엑스트린	엑스트린 : 20% (비수리추출물 고형분대비)		
↓				
건조 및 냉각		온도 : inlet 180℃±10℃	isovitexin 0.05% isovitexin : 0.5 mg/g	
↓				
야관문추출분말			isovitexin 0.05% isovitexin : 0.5 mg/g	18.88%

○ 정제수는 국내 규격에 적합함을 확인하였음 [첨부 3-2].

- 주정(에탄올), hexan, EtoAc, 디클로메탄, BaOH 분획별로 기능성분 확인 후 활용
- 새로 분리 된 성분들의 기능성 확인 후 PCT 특허출원 예정



2. 시제품 제작

- 과립, 대환, 음료 시제품 제작

형태	사진
과립	
대환	
음료	

### 3. 개별인정 신청 준비

식품안전나라

Page 1 of 1

#### 접수증

접수번호: 20180797499 접수일자: 2018.08.08

민원사무명	건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)
신청번호	5369594
민원인 (대표 또는 대리인)	최종현(20040015104)
처리예정일	2019.02.01
처리주관부서	식품의약품안전평가원 영양기능연구팀(-)
안내사항	※ 방문수령의 경우에는 교부받고자 하는 민원실에 본 접수증을 제출하여야 하며, 본인의 신분증 또는 대리인인 경우에는 위임장을 제시하여야 민원서류를 수령하실 수 있습니다.
수수료	1,900,000

위 건영의 민원을 접수하였습니다.

[https://www.foodsafetykorea.go.kr/popup/civilReceipt.do?cvpl\\_rcpt\\_n...](https://www.foodsafetykorea.go.kr/popup/civilReceipt.do?cvpl_rcpt_n...) 2018-08-31



**1. 1. 제출자료의 총괄 요약본**

신청원료 개요

(최초, 변경)

회 사 명		(주)네추럴웨이 (대표이사 : ) 최종현				
영업허가(신고번호)		제조업 <input checked="" type="checkbox"/>	제 2004-서울청-0013호	수입업 <input type="checkbox"/>		
주소 및 연락처		* 경기도 포천시 해룡로 83-135 * (연락처) 031-535-7674 (팩스) 031-534-8114				
		담당자	(이름) 유상우 (연락처)			
신청 원료명		야관문추출분말				
심사 대상 분류	개별인정 원료	·새로운 원료 <input checked="" type="checkbox"/>	신청 기능성	남성갱년기 개선에 도움을 줄 수 있음		
			신청 섭취량	야관문추출분말로서 1g/일		
	고시된 원료	·기능성 추가 <input type="checkbox"/> ·섭취량 변경 <input type="checkbox"/> ·제조방법 변경 <input type="checkbox"/> ·기준규격 변경 <input type="checkbox"/> ·시험방법 변경 <input type="checkbox"/>	(변경 전)			
			(변경 후)			
(변경 전)						
국내제조 <input type="checkbox"/> 수입 <input type="checkbox"/>		수입인 경우	수리번호	수출국		
			제조회사			
			소재지			
모듬토의 <input type="checkbox"/>		실시 날짜 :				
품목설명회 <input type="checkbox"/>		희망 날짜 :				

제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부분호	비고
1. 제출자료 전체의 총괄 요약본		<input checked="" type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료				
2.1	기원	<input checked="" type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외		

2.2	개발경위	■국내 □국외		
2.3	국내·외 인정·허가 현황	■국내 □국외		
2.4	국내·외 사용 현황	■국내 □국외		
<b>3. 제조방법 및 그에 관한 자료</b>				
3.1	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사가 발행한 자료	■예 □아니오	3-1	
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	■예 □아니오	3-1	
3.3	사용된 원료·첨가물이 식품 및 첨가물공전에 적합한지 여부	■ 예 (모두, 일부) □ 아니오	3-2	
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량변화	■예 □아니오	3-1	
3.5	주요공정별 수율 변화	■예 □아니오		
<b>4. 원료의 특성에 관한 자료</b>				
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성상, 물성 등	■예 □아니오	4-1	
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	■예 □아니오 □기능성분 ■지표성분		
4.3	영양성분정보자료	■예 □아니오	4-1	
<b>5. 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료</b>				
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	■예 □아니오		
	※ 기능성분(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함 * 여러 번(3 LOT)의 시험성적서	■예 □아니오	5-1	
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도, 구조동정, 유효기간 등 정보 추가)	■예 □아니오 ■ 시판 표준품 □ 자사 표준품		
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법	■예 □아니오 □ 공인 시험방법 ■ 자사 시험방법		
	자사방법인 경우 밸리데이션 자료 추가)		5-2	
연번	제출자료	제출여부	첨부번호	
<b>6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료</b>				
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 총비소, 총수은)의 규격 및 근거	■예 □아니오		
	※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	■예 □아니오	6-1	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	■예 □아니오	6-2	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 곰팡이독소, 미생물 등)	□예 ■아니오		
	※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	□예 ■아니오		

6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법		■예 □ 아니오	
<b>7. 안전성에 관한 자료 (의사결정도 : )</b>				
7.1	섭취근거 정보		■예 □ 아니오	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보		■예 □ 아니오	
7.3	섭취량 평가 정보		■예 □ 아니오	7-1
7.4	영양평가, 생물학적유효성, 인체적용시험 정보		■예 □ 아니오	7-2
7.5	독성시험 * GLP기관 확인 여부	단회투여독성시험	□예 ■ 아니오	
		3개월 반복투여독성시험	□예 ■ 아니오	
		유전독성시험	□예 ■ 아니오	
		특수독성 (생식, 항원성, 면역, 발암성 )	□예 ■ 아니오	
<b>8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료</b>				
8.1	시험관시험	■ 신청원료 (논문 3 편) * 시험기관 :		8-1,8-2,8-3
		□ 유사원료 (논문 편)		
8.2	동물시험	■ 신청원료 (논문 2 편) * 시험기관 :		8-1,8-3
		■ 유사원료 (논문 1 편)		8-4
8.3	인체적용시험	■ 신청원료 (IRB 승인 보고서 1 편, 논문 편) * 인체적용시험기관 :		7-2
		□ 유사원료 (IRB 승인 보고서 편, 논문 편)		
<b>9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료</b>				
9.1	섭취량 및 근거		■예 □ 아니오	
9.2	섭취방법 및 근거		■예 □ 아니오	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거		■예 □ 아니오	
<b>10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료</b>				
10.1	2. 건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부		■예 □ 아니오	
10.2	3. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부		■예 □ 아니오	
<b>□ 전체 내용 요약</b>				
항 목	4. 주요 내용			
1. 원료명	야관문추출분말			
2. 원재료	야관문(비수리) (학명: <i>Lespedeza cuneata</i> G.Don, 사용부위 : 줄기, 잎)			

3.기능 (지표)성분	지표성분 : 이소비텍신(isovitexin)		
4. 제조 공정	원료(야관문) → 전처리(세척, 파쇄) → 1차 추출(정제수) → 여과 → 2차 추출(정제수) → 여과 → 농축 → 배합 및 살균 → 분무건조 → 야관문추출분말(신청 원료)		
5. 규격 및 시험방법	1) 정상 : 이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색의 분말 2) isovitexin(지표성분) : 0.4-0.6 mg/g 3) 납(mg/kg) : 2 이하 4) 총비소(mg/kg) : 5 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 1 이하 6) 총수은(mg/kg) : 1 이하 7) 대장균군 : 음성		
	기능(지표)성 분 시험법	1) 자사시험법 2) 기기분석 조건(UV 270nm, INNO C18 column(250×4.6mm, 5μm) 또는 이와 동등한 것	
	규격외 (잔류농약)	건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정 중 「식품의 기준 및 규격」에 신청원료에 대한 농약의 잔류허용기준은 없으며, 이에 따라 58가지 잔류농약에 대하여 국내 식품위생검사기관 시험결과 '불검출'임을 확인함	
6. 안전성	의사결정도	섭취경험이 있는 야관문( <i>Lespedeza cuneata</i> G.Don)를 물을 이용하여 단순 추출, 건조한 것으로 섭취량이 일상 섭취량보다 증가하지 않았다 판단하여 의사결정도 '나'에 해당	
	섭취 근거	<국내 인정/허가 현황> ◦ 야관문(비수리)은 식품의 원료로 사용이 가능함[식규 제2016-43호, '2016.05.31'].  <국외 인정/허가 현황> ◦ 중국 : 0.5~1냥(신선한 것은 1~2냥)을 달여서 복용하거나 고기와 함께 약한 불에 고아 복용한다.[중약대사전]	
	안전성 정보	-간기능, 신장기능 검사 결과 안전성에 이상이 없음 -지질대사능, 당대사능 측정 결과 안전성에 이상이 없음 -인체적용시험에서 시험식품과 관련된 이상 반응은 나타나지 않음	
	섭취량 평가	◦ 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 1g/일 ◦ 야관문추출분말은 원재료(야관문)로서 약 5.3g(수율 약 18.88%)을 섭취하는 것에 해당하며 일상 섭취량(37.5g)보다 증가하지 않았다.	
	인체적용시험	◦ 심각한 이상반응은 확인되지 않음 (야관문추출분말로서 1g/일 섭취 기준)	
독성 시험	◦ 해당사항 없음		

	기타 사항	- 없음
	섭취시주의 사항	◦ 임산부와 수유부는 섭취 시 주의
7. 기능성	신청 기능성	남성갱년기 개선에 도움을 줄 수 있음
	신청 일일섭취량	야관문추출분말로서 1g/일
	시험관시험	[신청원료] ◦ NO 생성량이 대조군 $6.18 \pm 0.29 \mu\text{M}$ 보다 100mg/mL 투여군에서 $6.89 \pm 0.18 \mu\text{M}$ 로 증가하였고 250mg/mL투여군에서 $7.58 \pm 0.19 \mu\text{M}$ 로 증가함.
	동물시험	[신청원료] ◦ male Sprague-Dawley rats(weighing 350-380g), 100mg/Kg or 250mg/Kg, 4주, 구강투여 -혈관확장성 기능평가의 유의적 증가 : NO는 대조군 $3.70 \pm 0.65 \text{nmol/mL}$ 보다 100mg/Kg 에서는 $4.27 \pm 0.66 \text{nmol/mL}$ , 250mg/Kg 에서는 $5.37 \pm 0.11 \text{nmol/mL}$ 로 증가함 nNOS는 대조군보다 증가하는 경향을 보였지만 유의적 차이는 없음 cGMP는 대조군 $0.022 \pm 0.014 \text{ IU/L}$ 보다 100mg/Kg 에서는 $0.034 \pm 0.007 \text{ IU/L}$ , 250mg/Kg 에서는 $0.037 \pm 0.015 \text{ IU/L}$ 로 증가함 PGE <sub>2</sub> 는 변화 없음 -성기능평가의 유의적 증가 : DHT는 대조군 $316.71 \pm 57.56 \text{ pg/mL}$ 보다 100mg/Kg 에서는 $400.03 \pm 53.75 \text{ pg/mL}$ , 250mg/Kg 에서는 $495.06 \pm 89.41 \text{ pg/mL}$ 로 증가함 총 테스토스테론은 차이가 없음 HSD17B13은 대조군 $0.559 \pm 0.073 \text{ IU/L}$ 보다 100mg/Kg 에서는 $0.634 \pm 0.078 \text{ ng/mL}$ , 250mg/Kg 에서는 $0.753 \pm 0.0056 \text{ ng/mL}$ 로 증가함 HSBG는 대조군보다 증가하는 경향을 보였지만 유의적 차이는 없음 ※시험물질 : 야관문추출분말
	인체적용시험	[신청원료] ◦ 만 45세 이상의 남성으로 갱년기 증상을 보이는 자(n=60), 1일 1,000mg/8주, DB, parallel, placebo - ADAM 설문조사에서 시험식품군은 대조식품군과 비교하여 남성갱년기 증상을 나타내는 “예” 수치가 유의적으로 감소(p=0.044 by ANCOVA) - IIEF 설문 항목에 관한 총점수가 대조식품군보다 유의적으로 증가(p < 0.007 by ANCOVA). 또한 세부항목이 평균점수인 Erectile function(p=0.015 by ANCOVA), Orgasmic function(p=0.007 by ANCOVA), Sexual desire(p=0.011 by ANCOVA), Intercourse satisfaction(p=0.018 by ANCOVA), Overall Satisfaction(p=0.006 by ANCOVA) 군 간 유의한 차이를 보여 시험식품군에서



	<p>더 나은 향상을 보임.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- IPSS는 총점수가 유의한 감소를 보였으나 대조식품군과 비교하였을 때는 유의성이 없었음. 일상적 피로감은 두 개의 domain으로 나누어 domain1은 점수가 높을수록 피로도가 높게, domain2는 점수가 높을수록 피로도가 낮도록 설정하였는데 두 domain에서 시험식품군이 대조식품군에 비해 피로도가 유의적인 감소를 보임(p=0.005, 0.046 by ANCOVA)</li> <li>- 2차 유효성 평가로 혈액 중 테스토스테론 검사에서 총 테스토스테론과 자유 테스토스테론은 두 군 모두 증가하는 경향을 보였지만 기저치에 대비 유의성이 있지는 않았다. 단, 두 군 간의 비교에서는 테스토스테론(p=0.031 by ANCOVA)과 자유 테스토스테론(p=0.019 by ANCOVA)의 유의한 증가를 보임</li> </ul> <p>※인체적용시험기관 : 단국대학교병원, 시험책임자 : 김형지</p>
기타 사항	- 없음

<1협동기관 : 단국대학교병원>

### 1. 샘플 및 실험동물 계획

- SD rat 10주령 사용
- 야관문 시료: 총 6개 (곡성 10월/11월, 보은 10월/11월, 인제 10/11월)
- 양성대조군 시료: 총 3개 (50mg/kg 마카, 400 mg/kg 민들레, 25 mg/kg 비아그라)
- 시료는 매일 4주간 100 mg/kg과 250 mg/kg 씩 구강투여
- 기간 중 체중 측정
- 4 주차에 마취 후 혈청 채집, Sacrifice 후 간, 비장, 고환 추출



그림 1. 샘플 준비 및 시료 주입

### 2. 시험관적 독성평가

- 세포주는 ATCC에서 구매한 Primary Umbilical Vein Endothelial Cells; Normal, Human (HUVEC) (ATCC® PCS-100-010™)을 사용하였음.
- 세포들은 96-well 플레이트에  $1 \times 10^4$ 으로 분주하여 24 시간 배양시키고 분화를 유도시킨 다음 시료를 농도별로 가하고 다시 24 시간 동안 배양하여 세포에 대한 독성을 측정. MTT를 각 well당 첨가하고 3시간 배양 후 lysis solution 을 가하여 microplate reader (Molecular Devices Co.) 450 nm 에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교하여 세포의 생존율을 계산하였음.
- 마카, 민들레 500ug/ml 에서, 비아그라는 2ug/ml 저농도에서 세포독성이 관찰됨.

- 야관문 시료의 경우 500ug/ml 이하까지 세포독성이 발견되지 않았으나 보은 11월 시료의 경우 200ug/ml 농도에서부터 세포독성의 결과 관찰됨.

### 3. 시험관적 NO 생성량 평가

- 세포주는 ATCC에서 구매한 Primary Umbilical Vein Endothelial Cells; Normal, Human (HUVEC) (ATCC® PCS-100-010™)을 사용하였음.
- 세포들은 96-well 플레이트에  $1 \times 10^4$ 으로 분주하여 24 시간 배양시키고 분화를 유도시킨 다음 시료를 농도별로 가하고 다시 24 시간 후 상층액만 취하여 NO kit (Abcam, Beverly, MA, USA)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교하여 NO 발생량을 계산하였음.
- 마카의 경우 200ug/ml에서, 민들레의 경우 50ug/ml에서, 비아그라의 경우 200ug/ml 에서 NO 농도가 증가하기 시작함.
- 야관문 시료의 경우 인제 10월 시료를 제외한 모든 시료에서 NO 농도가 증가함.
- 인제 11월 시료는 50ug/ml 부터 유의한 NO 증가가 관찰됨.
- 보은 10월 시료 또한 50ug/ml 부터 유의한 NO 증가가 관찰됨.

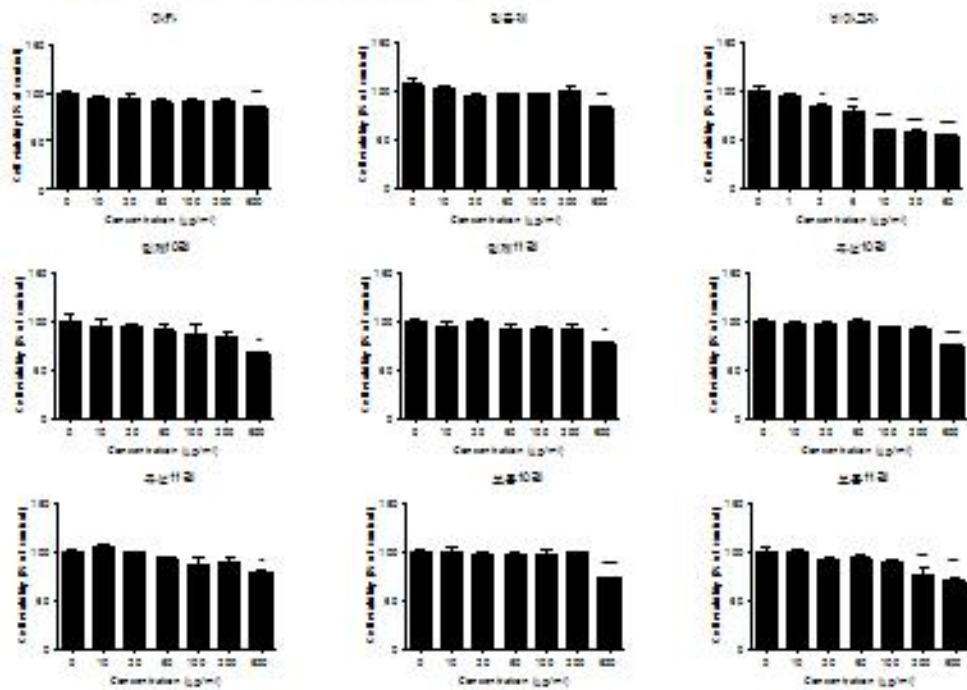


그림 2. 세포 독성 평가

마카, 민들레 500ug/ml 에서, 비아그라는 2ug/ml 저농도에서 세포독성이 관찰되었고 야관문 시료의 경우 보은 11월 시료를 제외하고 500ug/ml 이하까지 세포독성이 발견되지 않았음.

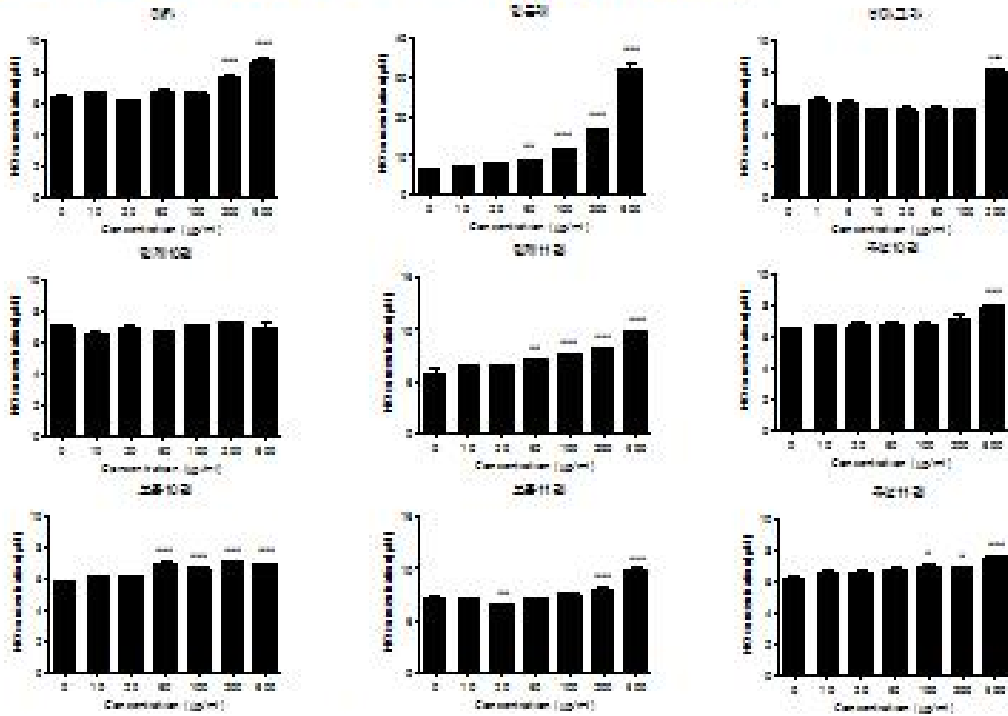


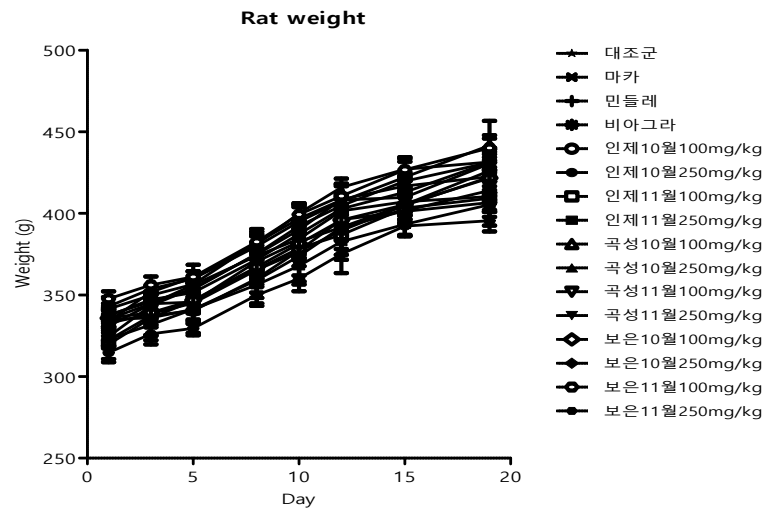
그림 3. 세포 NO 생성량 평가

인체 10월 시료를 제외한 모든 시료에서 NO 농도가 유의하게 증가하였음.

#### 4. in vivo 안전성 평가

- 전체 시료에 대한 몸무게의 감소는 발견되지 않았음.
- 전체 시료에 대한 비장의 변화는 발견되지 않았음.

a



b

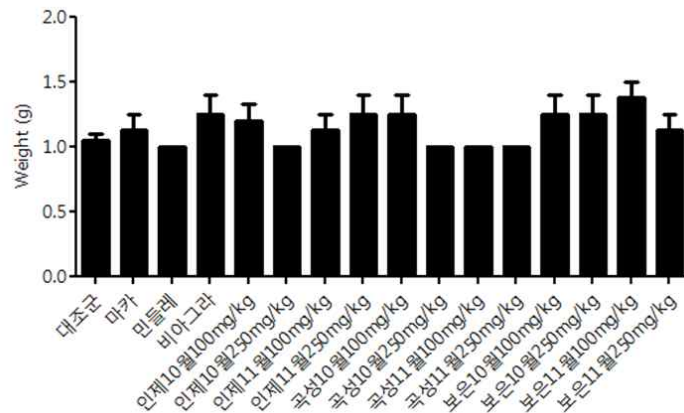
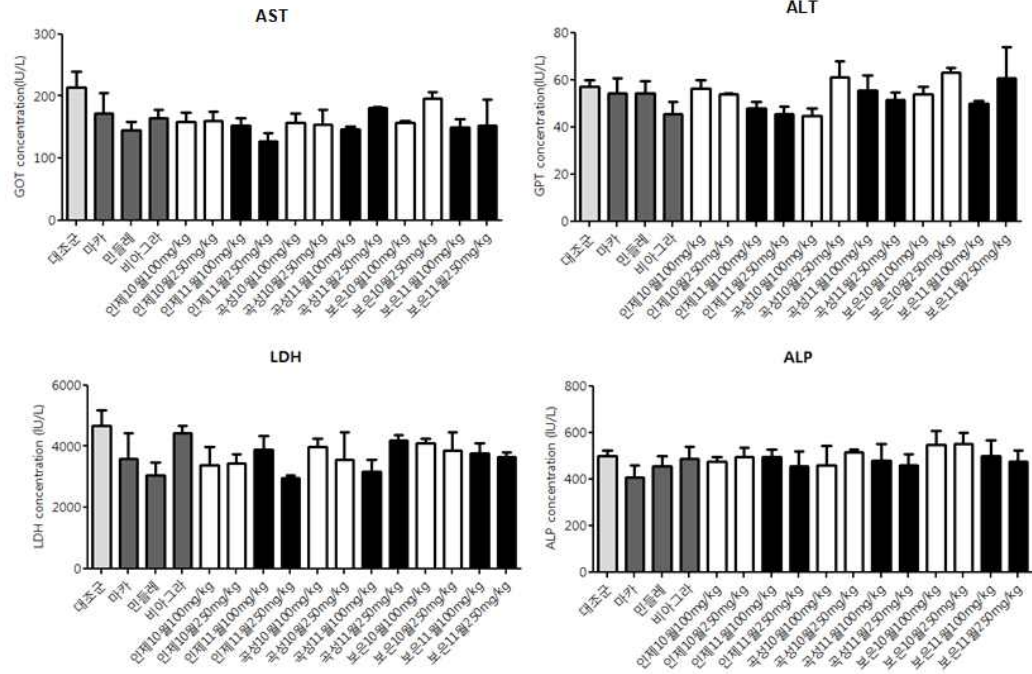


그림 4. 시료 섭취기간동안 몸무게 및 비장의 변화

a. 야관문 시료 섭취기간 동안의 몸무게 추이; b. 야관문 섭취 후 비장무게 변화

- 간기능 평가를 위해 AST (아스파르테이트 아미노전달효소), ALT (알라닌 아미노 전달효소), ALP (알카라인 포스파타제) 및 LDH (젖산 탈수소효소)를 조사함.
- 측정결과 야관문 섭취로 간기능에 영향을 미치는 결과를 관찰 할 수 없었음.
- 간 조직을 채취하여 형태학적 관찰 및 병리소견 평가를 실시한 결과 형태학적 이상이나 염증의 소견은 발견되지 않았음.

a



b

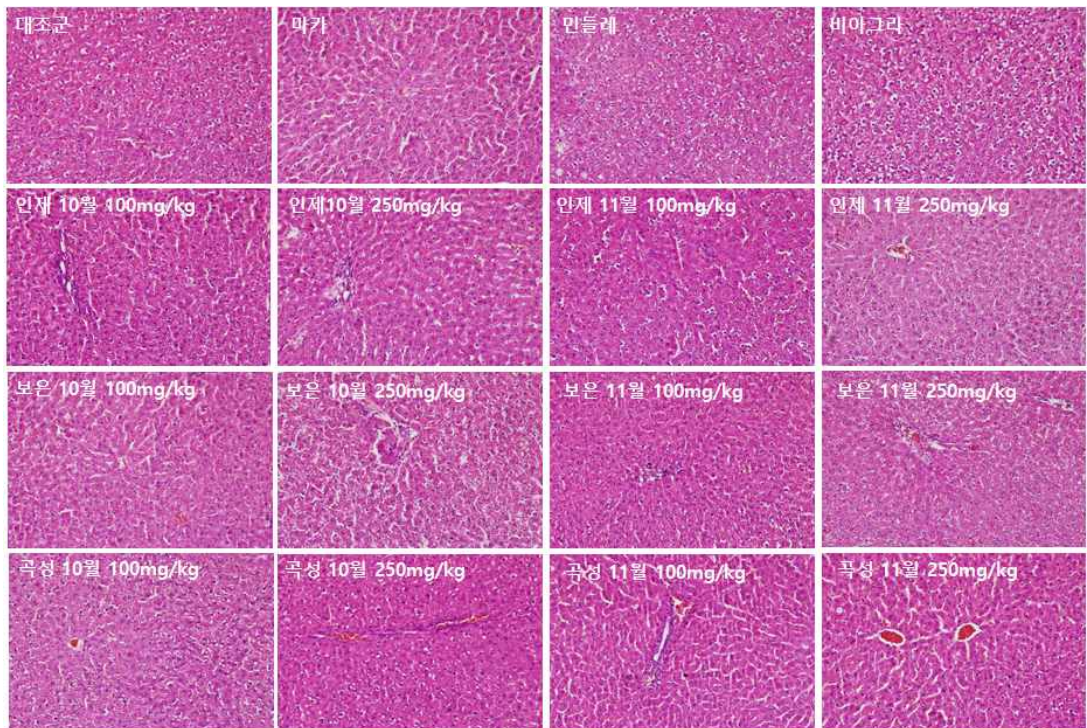


그림 5. 야관문 섭취 후 간 기능 평가

a. 야관문 시료 섭취 후 간기능 평가; b. 야관문 섭취 후 간의 형태학적 병리관찰 결과

- 신장기능 평가를 위해 BUN (Blood urea nitrogen) 및 Creatinine 조사함.
- BUN의 수치가 높으면 탈수, 출혈 및 신장기능을 의심함.
- Creatinine의 경우 신장기능이 저하되면 수치가 상승함.
- 야관문 섭취로 인한 신장기능 이상은 발견되지 않았음.

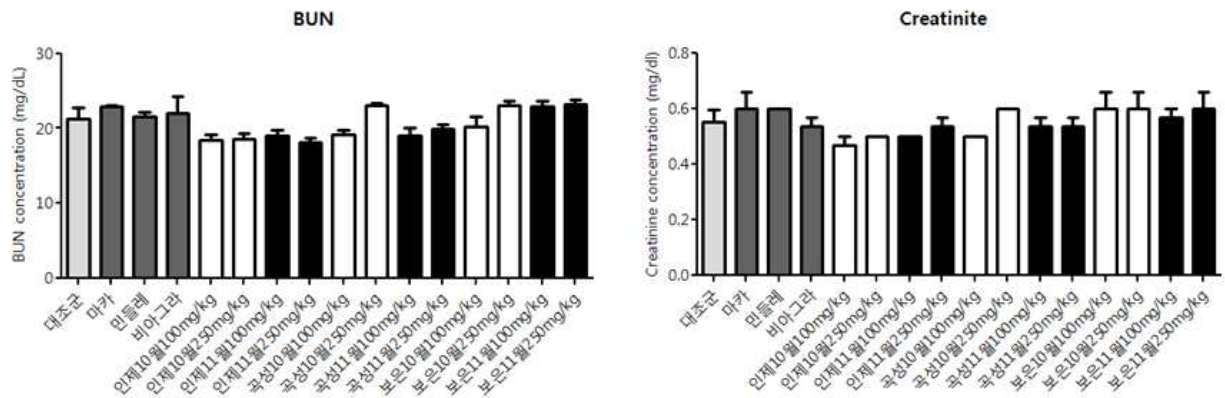


그림 6. 야관문 섭취 후 신장기능 평가

- 지질 대사 평가를 위해 Triglyceride, cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 수치를 측정함.
- 야관문 섭취로 특이적인 지질대사 관련 특이적인 상승을 관찰할 수 없었음.

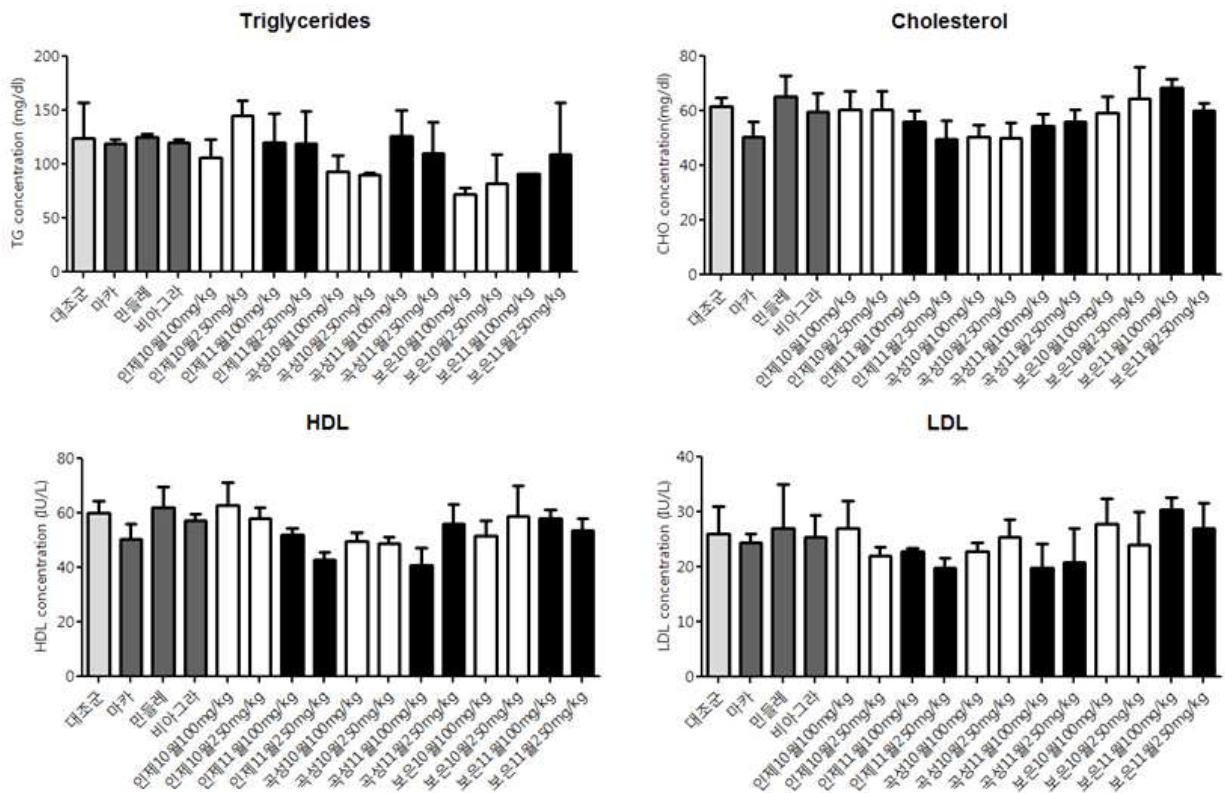


그림 7. 야관문 섭취 후 지질대사기능 평가

- 당 대사 평가를 위해 glucose 및 insulin 수치를 측정함.
- 야관문 섭취로 특이적인 당대사 관련 특이적인 상승을 관찰할 수 없었음.

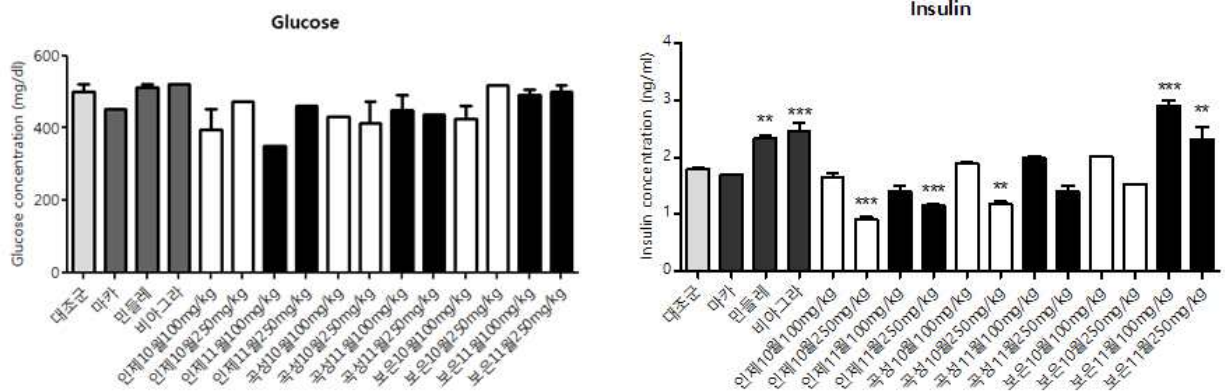


그림 8. 야관문 섭취 후 당대사기능 평가

### 5. 산화질소 및 혈관확장 유효성 평가

#### ① NO 생산능 측정

- 분리한 혈청에 ionomycin 을 처리하고 NO kit (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 정량하였음.
- NO 측정결과 곡성, 보은 시료가 대조군에 비해 유의한 결과를 보였음.

#### ② nNOS

- 분리한 혈청에 1uM 의 ionomycin 을 처리하고 2 시간 동안 배양한 후 상층액만 따로 옮겨 nNOS kit (R&D, Minneapolis, MN, USA) 를 사용하여 측정하였음.
- nNOS 측정 결과경우 곡성, 보은 시료가 대조군, 양성대조군 민들레, 비아그라 대비 유의한 결과를 보였음.

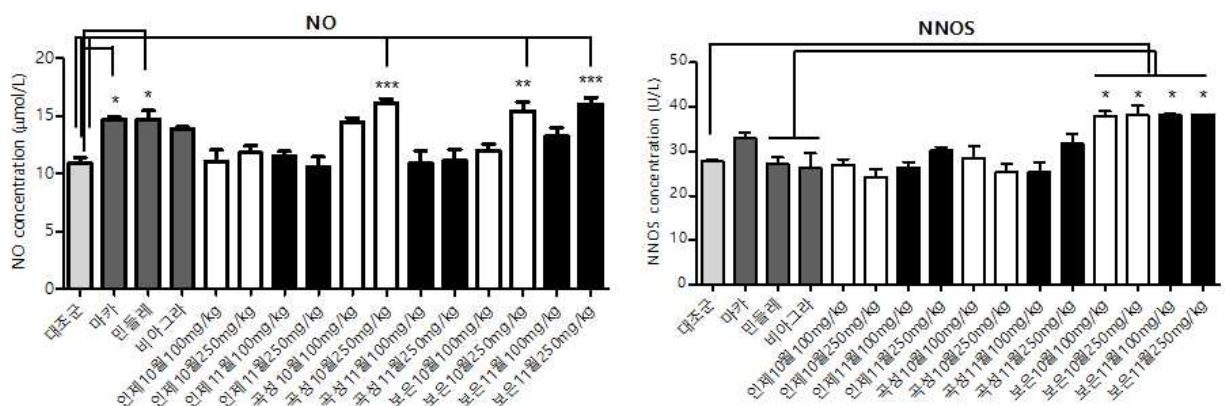


그림 9. 야관문 섭취 후 NO 생산능 평가

#### ③ cGMP

- 분리한 혈청에 ethanol 을 1:4로 첨가하고 2,500 rpm, 10분 동안 원심분리한 후 상층액만 분리하고 Vacuum에서 완전히 건조하여 비특이단백을 제거하였음. 동량의 생리식염수로 녹인 다음 cGMP enzyme immunoassay kit (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) 를 사용하여 측정하였음.
- cGMP 측정결과 곡성 11월과 보은 10월 시료가 대조군 대비 유의한 결과를 보였고 양성대조군 민들레 비아그라와 대비해도 유의하게 증가하였음.

#### ④ Prostaglandin (PGE)

- 분리한 음경해면체에 2 mL 의 차가운 Krebs solution (133mM NaCl, 4.7mM KCl, 2.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1.4mM NaHPO<sub>4</sub>, 1.64mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.6mM MgSO<sub>4</sub>, 7.7mM glucose) 에 넣고 마쇄한 다음 20분간 방치하고 상층액만 분리하여 Prostaglandin EIA kit (Cayman, Ahn Arbor, MI, USA) 를 사용하여 측정하였음.
- PGE<sub>2</sub> 경우 변화가 없었음.

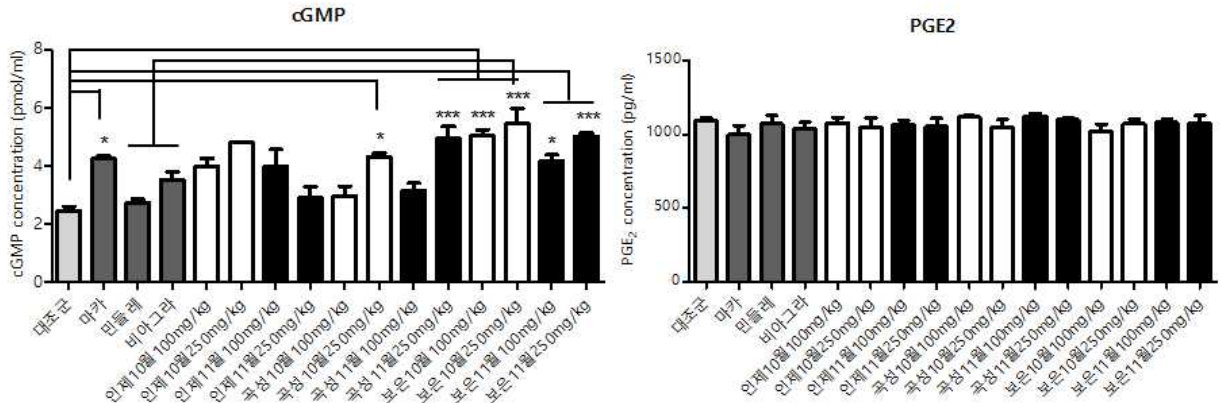


그림 10. 야관문 섭취 후 혈관확장 인자 평가  
cGMP 측정결과 곡성 11월과 보은 10월 시료가 대조군 대비 유의한 결과를 보였고 양성대조군 민들레 비아그라와 대비해도 유의하게 증가하였음

## 6. 남성 성기능 평가

### ① 17-beta HSD

- 분리한 혈청에서 17-neta HSD ELISA kit (Mybioscience, Beverly, MA, USA) 를 사용하여 측정하였음.
- HSD17B13의 경우 인제 및 보은 시료에서 대조군, 양성대조군 대비 유의한 결과가 관찰됨.

### ② SHBG (Sexual hormone binding globulin)

- 분리한 혈청에서 SHBG ELISA kit (Cusabio, Termacula, CA, USA) 를 사용하여 측정하였음.
- SHBG 의 경우 인제 11월 및 곡성 11월 시료에서 유의한 결과가 관찰됨.

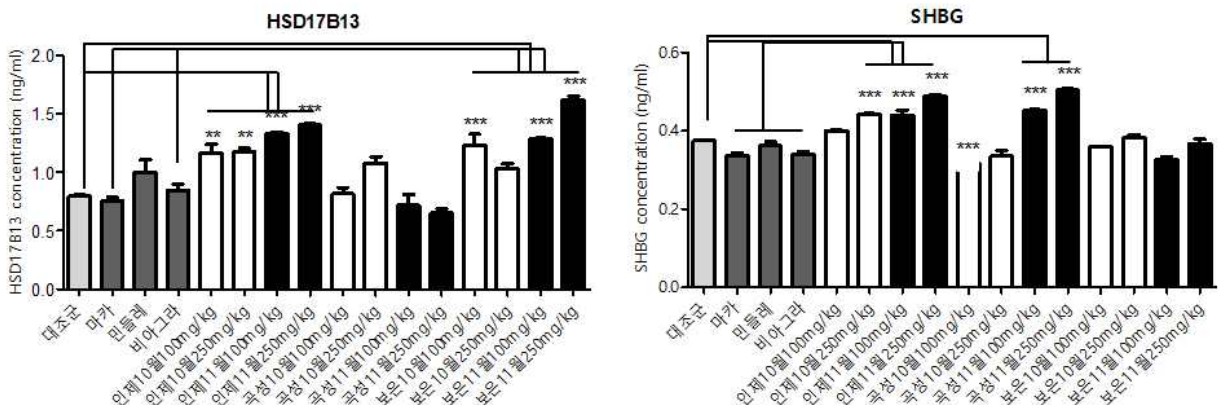


그림 11. 야관문 섭취 후 남성성기능 인자 평가-1  
HSD17B13의 경우 인제 및 보은 시료에서 대조군, 양성대조군 대비 유의한 결과가 관찰되었고 SHBG 의 경우 인제 11월 및 곡성 11월 시료에서 유의한 결과가 관찰됨

### ④ Free testosterone (dehydrotestosterone, DHT) 및 총 Testosterone 농도 측정



- 분리한 혈청에서 DHT ELISA kit (KMI Diagnostics, Inc., Minneapolis, MN, USA) 를 사용하여 측정하였음.
- DHT 측정결과 대조군과 양성대조군 대비인재, 보은, 곡성시료에서 유의한 결과가 관찰됨.
- Testosterone 측정결과 대조군 대비 보은 시료에서만 유의한 결과가 관찰됨.

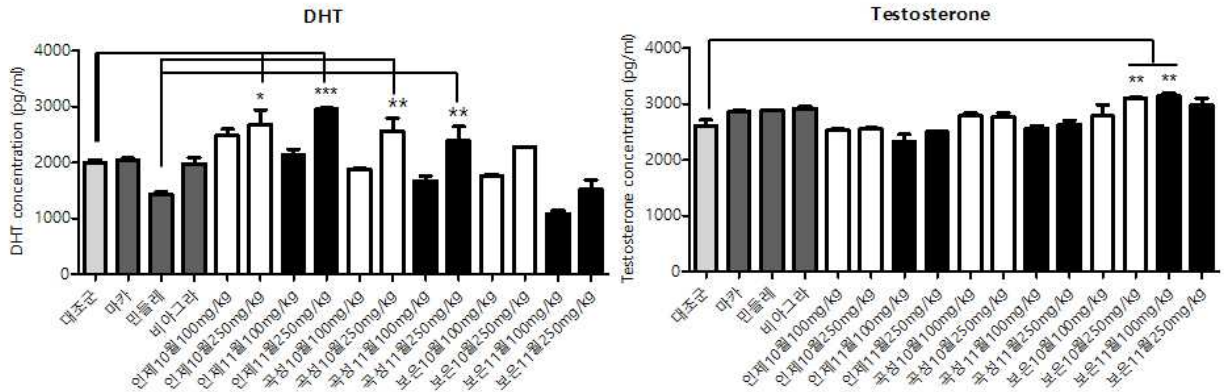


그림 12. 야관문 섭취 후 남성성기능 인자 평가-2  
DHT 측정결과 대조군과 양성대조군 대비인재, 보은, 곡성시료에서 유의한 결과가 관찰됨

<2협동기관 : 중앙대학교>

### 분석법의 신뢰성 검증

#### ○ 야관문 지표성분 isovitexin 설정근거

- ① 야관문 추출물에서 플라보노이드인 vitexin과 isovitexin이 존재함을 확인하였으며, 기존 문헌에서 여러 가지 활성이 보고되었음.
- ② HPLC 분석을 통하여 야관문 추출물에서 특이성과 대표성을 나타내며, 일정 수준 이상의 함량을 지니고 분석이 용이한 isovitexin을 지표성분으로 최종 설정함.

#### ○ 야관문 지표성분 isovitexin 분석방법

##### ① 장비와 재료

###### 1) 실험실 장비 및 소모품

부피플라스크(100 mL), HPLC용 유리병, 용매용 일회용 실린지, 여과용 멤브레인필터(PVDF, 0.45 μm), 초음파진탕기

###### 2) 분석장비

고속액체크로마토그래프, 자외부흡광광도검출기(UV Detector), INNO column C18 (250 X 4.6 mm, 5 μm) 또는 이와 동등한 것

##### ② 시약 및 시액

- 1) 표준물질 : Isovitexin (= Saponaretin), CAS No. : 38953-85-4

2) 일반시약

- 가. 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 나. 물(water, HPLC grade)
- 다. 아세트산(Acetic acid, glacial)

③ 시험과정

- 표준용액 제조: 표준물질(isovitexin) 1 mg을 메탄올 1 mL에 용해하여 표준원액으로 하고, 초음파 진탕기로 20분간 녹인 후 0.45 μm PVDF 멤브레인 필터로 여과하여 표준용액(1.5625, 3.125, 6.25, 12.5, 25 μg/mL)으로 함.
- 시험용액 제조: Lot1 20 mg을 취한 후 메탄올 1mL에 용해하여 20,000 μg/mL로 조제 후 밀봉한 다음 water bath에 30분간 진탕 후, sonication 10분 진행 후 식힌 다음 0.45 μm PVDF 멤브레인 필터로 여과하여 시험용액으로 함.

④ 기기분석

<고속액체크로마토그래프 조건>

항목	조건
기기	Agilent 1260 Infinity II Quat Pump, CA, USA DAD WR detector, CA, USA
칼럼	INNO C18 column (250 X 4.6 mm, 5 μm)
주입량	10 μL
이동상	Gradient 조건 [A 물(0.5% 아세트산) : B 아세토니트릴]
유속	1.0 mL/min
검출기 파장	UV 270 nm

<이동상 조건>

시간 (분)	용매	
	A (%)	B (%)
0	90	10
5	83	17
15	81	19
30	81	19
31	90	10
35	90	10

⑤ 계산

$$\text{Isovitexin 함량(mg/g)} = C \times V / W$$

C : 시험용액중의 Isovitexin 농도 (mg/mL)

V : 시험용액의 전량 (mL)

W : 시료채취량 (g)

○ 야관문 Lot별 지표성분 함량

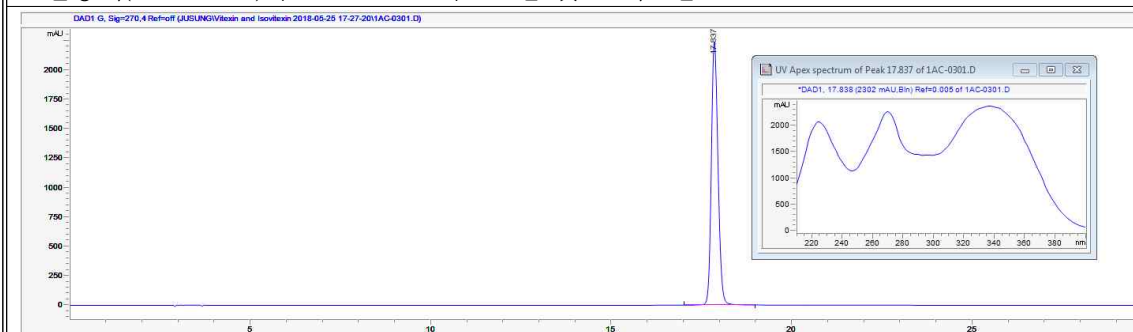
Lot	함량 (mg/g)	평균 함량 (mg/g)
Lot1	0.440	0.447 ± 0.006
Lot2	0.453	
Lot3	0.448	

○ 야관문 시험방법 밸리데이션

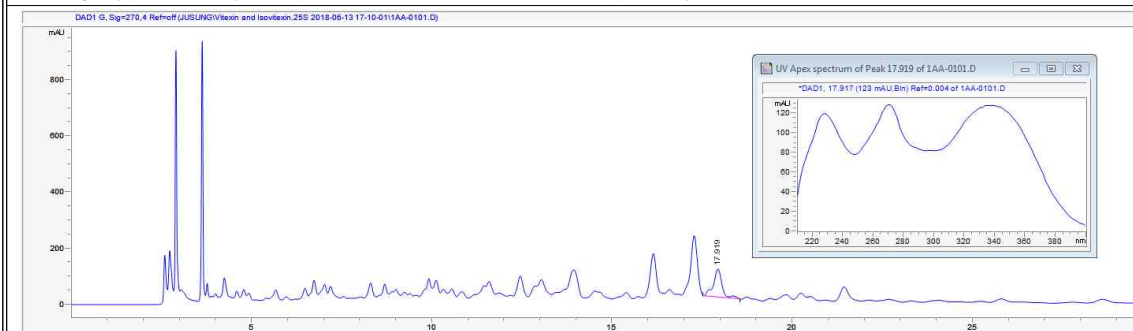
① 특이성(Specificity)

- 표준용액(isovitexin)과 시험용액(야관문 추출물)의 HPLC 크로마토그램을 통해 간섭물질에 대한 영향이 없음을 확인하였고, 머무름시간(17.8 min) 및 UV 스펙트럼의 패턴이 일치함을 확인함.

표준용액(isovitexin)의 HPLC 크로마토그램 및 스펙트럼



시험용액(야관문 추출물)의 HPLC 크로마토그램 및 스펙트럼



② 정확도(Accuracy)

- 검체 중 이미 알고 있는 분석물질 isovitexin 함량 0.00625 mg, 0.0125 mg, 0.025 mg 등으로 첨가하여 5회 이상 반복 측정하고 회수율을 구함.  
 - 시험결과가 참값에 근접한 정도를 나타냄(80% < 회수율 < 120%).

	함량(mg)		
	0.00625	0.0125	0.025
1	96.6	101.4	96.5
2	96.9	101.0	96.5
3	96.4	101.4	96.5
4	96.4	101.5	96.1
5	97.8	101.2	96.5
함량별 평균회수율(%)	96.82 ± 0.58	101.3 ± 0.2	96.42 ± 0.18
전체 평균회수율(%)	98.18		
회수율 구간(%)	96.42-101.3		

③ 정밀도(Precision)

<반복성>

- 반복성의 경우 3개 이상의 함량에 대해 5회 이상 반복 측정하고, 측정값들 사이의 근접한 정도를 구함.

	검체량		
	5.0 mg	7.5 mg	10.0 mg
1	0.494	0.492	0.495
2	0.500	0.495	0.495
3	0.491	0.494	0.492
4	0.495	0.495	0.496
5	0.492	0.494	0.494
분석값(mg/g)	0.494 ± 0.004	0.494 ± 0.001	0.494 ± 0.002
RSD(%) [검체 측정값에 대한 RSD]	0.81	0.20	0.40
RSD 구간(%)	0.20-0.81		

<재현성>

- 재현성의 경우 각 실험실 간 1개 이상의 함량에 대해 3회 이상 반복 측정하고, 측정값들 사이의 근접한 정도를 구함.

	실험실		
	A	B	C
1	0.508	0.507	0.510
2	0.510	0.508	0.509
3	0.512	0.511	0.511
4	0.500	0.499	0.499
5	0.500	0.500	0.511
분석값(mg/g)	0.506 ± 0.006	0.505 ± 0.005	0.508 ± 0.005
RSD(%) [검체 측정값에 대한 RSD]	1.19	0.10	0.98

④ 정량한계(LOQ)

1		2		3	
농도 (µg/mL)	피크 면적 (Au)	농도 (µg/mL)	피크 면적 (Au)	농도 (µg/mL)	피크 면적 (Au)
25	606.3020	25	605.9180	25	605.1480
12.5	310.4620	12.5	310.9850	12.5	310.1700
6.25	162.8600	6.25	161.1990	6.25	161.2290
3.125	80.1106	3.125	80.0626	3.125	80.8537
1.5625	40.004	1.5625	40.6508	1.5625	40.7084
기울기	24.077	기울기	24.067	기울기	24.012
y절편	6.7055	y절편	6.6179	y절편	7.0058
기울기 평균(s)	24.052		y절편의 표준 편차(σ)	0.2035	
정량한계	0.0846				

⑤ 직선성(Linearity)

- 분석대상물질 isovitexin의 함량을 5개 이상으로 하며, 측정하고자 하는 함량 범위에 고르게 분포하도록 하고, 최소 3회 이상 반복 측정함.
- 일정범위에 있는 검체 중 분석대상물질의 양에 대하여 직선적인 측정값을 얻어 낼 수 있음.
- r<sup>2</sup>이 0.9997로서 직선성을 나타냄.

농도( $\mu\text{g/mL}$ )	피크 면적(Au)
1.5625	40.4544
3.125	80.3423
6.25	161.7627
12.5	310.5390
25	605.78933
직선 회귀 방정식	$y = ax + b$
기울기(a)	24.052
y절편(b)	6.7764
결정계수( $r^2$ )	0.9997

### 3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

3-2. 목표 달성여부

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

### 4. 연구결과의 활용 계획 등

○ 사업화계획

1. 생산 계획

구분		(2019년) 개발 종료 후 1년	(2020년) 개발 종료 후 2년	(2021년) 개발 종료 후 3년
국 내	시장점유율(%)	5%	12%	20%
	판매량(단위:개)	판매량(단위: 41,667개 )	판매량(단위: 125,000개 )	판매량(단위: 250,000개)
	판매단가(원)	120,000원	120,000원	120,000원
	국내매출액(백만원)	5,000	15,000	30,000
해 외	시장점유율(%)	0.5%	1.2%	2%
	판매량(단위:개)	판매량(단위: 41667개 )	판매량(단위: 125,000개 )	판매량(단위: 250,000개)
	판매단가(\$)	190,000	190,000	190,000
	해외매출액(백만\$)	6	18	36
당사 생산능력1)		1,000,000	1,900,000	4,000,000

2. 투자 계획

(단위 : 백만원)

항목		(2019년) 개발 종료 후 1년	(2020년) 개발 종료 후 2년	(2021년) 개발 종료 후 3년
매출원가1)		1,100	3,300	6,600
판매관리비2)		825	2475	4950
자본적 지출	토지			
	건물/건축물			
	기계장치등	500	1000	2000
자본적지출 합계		500	1000	2000

### 3. 사업화 전략

: 제품홍보, 판로확보, 판매전략 등의 사업화 추진전략

가. 주관((주)네추럴웨이)

구분	구체적인 내용																									
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> <li>상용화 형태 : 환제 및 PTP 정제</li> <li>수요처 : 홈쇼핑, 주요 백화점 및 대형마트, 온라인 쇼핑몰</li> <li>예상 단가 : 120,000원</li> <li>개발 투입인력 및 기간 : 개발 투입인력 5명, 기간 6개월</li> </ul>																									
상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> <li>자체 공장을 통한 제품생산 및 품질관리</li> <li>분말의 수용성,유동성, 균질도 등을 최적화 시키는 과립제조와 미세분말 및 펠릿(Seed)의 분말표면코팅 기술력 확보</li> <li>중량, 체적 등 기준규격을 세밀하게 생산</li> <li>롤러코팅식 자동 제환기를 이용하여 경질소환, 대환 등이 생산 가능</li> <li>이중캡충진기, 스틱포장기, PTP포장기, 사면포장기, 삼면포장기, 이열포장기, 로타리파우치포장기 확보</li> </ul>																									
상용화 계획 및 일정	<p>o 개별인정형 원료의 마케팅 전략 수립 : 2019년 1/4분기</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Phase I Diagnose</th> <th>Phase II Hit Idea &amp; Concept Creation</th> <th>Phase III STP Strategy</th> <th>Phase IV Coaching &amp; Advisory</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>목표</td> <td>"Market Chance Extraction" 사업 시장 기회 도출</td> <td>"Hit Concept Development" 혁신적인 아이디어 및 concept 도출</td> <td>"STP, 4P Mix &amp; Launching" 차별적 Positioning과 성공적 4P Mix 포괄적이고 효과적인 마케팅 전략</td> <td>내부 실행력 강화 전략대 형성</td> </tr> <tr> <td>개발 방법론/방식</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>Triangle Work Shop™</li> <li>Pest Analysis</li> <li>SMC Model™</li> <li>Chance Recheck™</li> </ul> </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>Seri-Coig™</li> <li>E2 balance™</li> <li>Value Transfer™</li> <li>USP Logic Trip™</li> <li>Concept Evaluation Process™</li> </ul> </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>2 way Segmentation</li> <li>Target Pinsette™</li> <li>Positioning Cascading™</li> <li>UPP 13way™</li> <li>MISF™, S-Big Picture</li> <li>IMC™, TTL Communication</li> </ul> </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>Coaching &amp; Advisory</li> <li>Education</li> </ul> </td> </tr> <tr> <td>조사</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>U&amp;A조사 (On-line)</li> <li>전문가 Depth Interview (Delphi)</li> </ul> </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>1차 Test : 경쟁조사 FGD</li> <li>2차 Test : Concept &amp; Product Test (HUT)</li> </ul> </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>Survey Data Analysis</li> </ul> </td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>비밀보유/비밀유지</td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>Internal Interview - Project Needs 정의</li> <li>Data Research - 2차 자료 조사 시장사업 구조 분석</li> <li>사업 전략 리뷰 - 내부 전략의 불안정 - 기존 전략에 대한 평가</li> <li>Quick &amp; Core FGD</li> <li>Triangle Work Shop</li> </ul> </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>Hit Idea 개발 - Seri Profiling - Key Hit Point 도출 및 검증 - COIG 아이디어 개발 - Idea Screening</li> <li>Hit Concept 개발 - Mega Hit concept 개발 - Main Benefit Creation 개발 - USP 도출 - Ingredient Branding 개발</li> <li>Concept 검증 및 경고합 - 조사결과 발표 조사 진행 - 조사분석</li> </ul> </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>STP 전략 수립 - 신규 브랜드 concept 고객반응조사 결과를 통해 최적의 STP 도출</li> <li>차별화가 가능한 positioning 수립 - 컨셉 시장 수요 예측</li> <li>4P MIX Guideline - 성공적인 시장 진입을 위한 최적의 4P Mix 조합 도출 - 제품 이미지 전략, 가격 전략, 유통 전략, 커뮤니케이션 전략 수립 - 소비자조사 결과를 바탕으로 가격 설정</li> <li>마케팅 전략 및 실행 프로그램 설계 - BTL Communication 전략 설계</li> </ul> </td> <td> <ul style="list-style-type: none"> <li>전략실행 관련 자문</li> <li>DNP Partner Networking</li> </ul> </td> </tr> </tbody> </table>		Phase I Diagnose	Phase II Hit Idea & Concept Creation	Phase III STP Strategy	Phase IV Coaching & Advisory	목표	"Market Chance Extraction" 사업 시장 기회 도출	"Hit Concept Development" 혁신적인 아이디어 및 concept 도출	"STP, 4P Mix & Launching" 차별적 Positioning과 성공적 4P Mix 포괄적이고 효과적인 마케팅 전략	내부 실행력 강화 전략대 형성	개발 방법론/방식	<ul style="list-style-type: none"> <li>Triangle Work Shop™</li> <li>Pest Analysis</li> <li>SMC Model™</li> <li>Chance Recheck™</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Seri-Coig™</li> <li>E2 balance™</li> <li>Value Transfer™</li> <li>USP Logic Trip™</li> <li>Concept Evaluation Process™</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2 way Segmentation</li> <li>Target Pinsette™</li> <li>Positioning Cascading™</li> <li>UPP 13way™</li> <li>MISF™, S-Big Picture</li> <li>IMC™, TTL Communication</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coaching &amp; Advisory</li> <li>Education</li> </ul>	조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>U&amp;A조사 (On-line)</li> <li>전문가 Depth Interview (Delphi)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1차 Test : 경쟁조사 FGD</li> <li>2차 Test : Concept &amp; Product Test (HUT)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Survey Data Analysis</li> </ul>	-	비밀보유/비밀유지	<ul style="list-style-type: none"> <li>Internal Interview - Project Needs 정의</li> <li>Data Research - 2차 자료 조사 시장사업 구조 분석</li> <li>사업 전략 리뷰 - 내부 전략의 불안정 - 기존 전략에 대한 평가</li> <li>Quick &amp; Core FGD</li> <li>Triangle Work Shop</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hit Idea 개발 - Seri Profiling - Key Hit Point 도출 및 검증 - COIG 아이디어 개발 - Idea Screening</li> <li>Hit Concept 개발 - Mega Hit concept 개발 - Main Benefit Creation 개발 - USP 도출 - Ingredient Branding 개발</li> <li>Concept 검증 및 경고합 - 조사결과 발표 조사 진행 - 조사분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>STP 전략 수립 - 신규 브랜드 concept 고객반응조사 결과를 통해 최적의 STP 도출</li> <li>차별화가 가능한 positioning 수립 - 컨셉 시장 수요 예측</li> <li>4P MIX Guideline - 성공적인 시장 진입을 위한 최적의 4P Mix 조합 도출 - 제품 이미지 전략, 가격 전략, 유통 전략, 커뮤니케이션 전략 수립 - 소비자조사 결과를 바탕으로 가격 설정</li> <li>마케팅 전략 및 실행 프로그램 설계 - BTL Communication 전략 설계</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>전략실행 관련 자문</li> <li>DNP Partner Networking</li> </ul>
	Phase I Diagnose	Phase II Hit Idea & Concept Creation	Phase III STP Strategy	Phase IV Coaching & Advisory																						
목표	"Market Chance Extraction" 사업 시장 기회 도출	"Hit Concept Development" 혁신적인 아이디어 및 concept 도출	"STP, 4P Mix & Launching" 차별적 Positioning과 성공적 4P Mix 포괄적이고 효과적인 마케팅 전략	내부 실행력 강화 전략대 형성																						
개발 방법론/방식	<ul style="list-style-type: none"> <li>Triangle Work Shop™</li> <li>Pest Analysis</li> <li>SMC Model™</li> <li>Chance Recheck™</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Seri-Coig™</li> <li>E2 balance™</li> <li>Value Transfer™</li> <li>USP Logic Trip™</li> <li>Concept Evaluation Process™</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2 way Segmentation</li> <li>Target Pinsette™</li> <li>Positioning Cascading™</li> <li>UPP 13way™</li> <li>MISF™, S-Big Picture</li> <li>IMC™, TTL Communication</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Coaching &amp; Advisory</li> <li>Education</li> </ul>																						
조사	<ul style="list-style-type: none"> <li>U&amp;A조사 (On-line)</li> <li>전문가 Depth Interview (Delphi)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1차 Test : 경쟁조사 FGD</li> <li>2차 Test : Concept &amp; Product Test (HUT)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Survey Data Analysis</li> </ul>	-																						
비밀보유/비밀유지	<ul style="list-style-type: none"> <li>Internal Interview - Project Needs 정의</li> <li>Data Research - 2차 자료 조사 시장사업 구조 분석</li> <li>사업 전략 리뷰 - 내부 전략의 불안정 - 기존 전략에 대한 평가</li> <li>Quick &amp; Core FGD</li> <li>Triangle Work Shop</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hit Idea 개발 - Seri Profiling - Key Hit Point 도출 및 검증 - COIG 아이디어 개발 - Idea Screening</li> <li>Hit Concept 개발 - Mega Hit concept 개발 - Main Benefit Creation 개발 - USP 도출 - Ingredient Branding 개발</li> <li>Concept 검증 및 경고합 - 조사결과 발표 조사 진행 - 조사분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>STP 전략 수립 - 신규 브랜드 concept 고객반응조사 결과를 통해 최적의 STP 도출</li> <li>차별화가 가능한 positioning 수립 - 컨셉 시장 수요 예측</li> <li>4P MIX Guideline - 성공적인 시장 진입을 위한 최적의 4P Mix 조합 도출 - 제품 이미지 전략, 가격 전략, 유통 전략, 커뮤니케이션 전략 수립 - 소비자조사 결과를 바탕으로 가격 설정</li> <li>마케팅 전략 및 실행 프로그램 설계 - BTL Communication 전략 설계</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>전략실행 관련 자문</li> <li>DNP Partner Networking</li> </ul>																						

<사업화 4P 전략>

- product : 남성갱년기의 대명사의 야관문을 이용한 최초의 개별인정형 제품으로 포지셔닝하여 제품의 경쟁력 세울 계획
- price : 시장경쟁력을 위해서 타 남성갱년기 건강기능식품과 비교하여 적절하고, 소비자들 입장에서 합당한 선으로 가격결정 할 계획
- place : 최근 트렌드에 맞게 온·오프라인 전반에 걸친 유통전략 필요. 특히 홈쇼핑과 동시에 제품 론칭을 기획하여 매출에 대한 기대효과 바라 볼 계획
- promotion : 현재 계획은 없으나, 인지도 향상을 위해서 명절에만 프로모션 계획 중

<사업화 전략을 위한 MKT 일정 Process>

① 시장 분석 및 기회도출

- 내부 전략가설 공유 및 Key Man Interview
- 국내외 관련시장 트렌드 분석, 2차 자료 분석
- U&A 조사 (On Line Survey)
  - 국내시장 주요 경쟁자 분석/자사분석
  - 해외시장 주요 브랜드 벤치마킹
  - 네추럴웨이 시장 기회 도출

② 혁신 아이디어 및 컨셉 도출

2-1) Product Hit Idea

- Key Hit Point 도출
- 상품화 아이디어 개발
- 아이디어 스크리닝

2-2) Hit Concept

- Hit Concept 개발
- Main Benefit 도출
- USP 도출

2-3) 검증 및 정교화

- 가설 컨셉 검증 (FGD : Focus Group Discussion )
- 컨셉 수정 및 정교화 : Winning Concept 설정

③ 브랜드 개발

- 브랜드 Identity 설계
- Brand Textbook
- 신규 브랜드 네임 & 디자인 개발

④ STP 전략

- Sales Communication Target 규정
- Positioning 목표 설정



⑤ 상품화

5-1) 내용물 개발

- 인허가 (임상)
- 제형 및 응용방법 결정 및 처방확정

5-2) 용기개발

- 용기& 그래픽 디자인 개발
- 용기 업체 선정 / 생산 Feedback
- 초도 생산 및 입고
- Concept& Product Test(HUT 조사 : Home Using Test )

⑥ 런칭

- 가격 전략
- 유통 전략
- 런칭/ IMC 전략 수립
- MD / In-store Promotion / 판촉물 기획 및 준비
- 런칭 프로그램 실행

⑦ 출시 후 관리

- 런칭 후 Brand Tracking
- 국제 박람회 참석
- 2차 상품화 준비

<Sales & Public Relations 전략>

① 인터넷 쇼핑몰 구축

- 네추럴웨이 홈페이지 카테고리 및 구성 요소 변경
- 컨셉에 맞는 쇼핑몰 디자인 및 Tone&Manner 변경
- 별도의 온라인 홈페이지 구축 및 현재 홈페이지에 카테고리 개설
- 온라인 상의 이벤트를 위한 마이크로 사이트 제작

② TV 홈쇼핑 광고

- 벤더사와의 전략적 제휴를 통한 홈쇼핑 채널을 탐색
- 제품을 효과적으로 알리기 위한 최적의 컨셉을 설정
- 제품을 효과적으로 전달할 수 있는 출연진 섭외
- 홈쇼핑 채널을 통한 런칭 및 광고

③ 소셜미디어 및 검색엔진 최적화

- 파워블로거 및 온라인 상의 영향력 있는 유저 섭외
- 제품에 대한 특성이나 소개글들을 블로그에 포스팅하여 포털사이트

에 노출

- 제품과 연관되는 연관검색어를 별도로 설정하여 이슈화

- 제품에 대한 블로그 및 페이스북 운영하여 소통의 극대화

④ 오프라인 프로모션

- 내부인력과 외주업체가 아이디어 협의하여 프로모션 방향 설정
- 도출된 아이디어를 통한 구체적인 세트 제작 및 프로모션 진행

4. 사업화를 위한 비즈니스 모델

가. BM 수립 배경

흔히 갱년기하면 여성들에게만 나타난다고 생각하지만 여성뿐 아니라 남성에게도 찾아온다. 남성의 경우 30대 이후부터 남성호르몬이 테스토스테론이 서서히 줄어드는데 이로 인해 찾아오는 심리적, 신체적 변화를 남성 갱년기라고 한다.

여성들의 갱년기가 그러하듯이 남성 갱년기 증상 역시 심리적으로 피로감, 우울감 등이 있으며, 신체적으로는 성욕의 감퇴, 발기력 감소, 체중감소 등이 나타난다.

이중 남성 갱년기의 대표적 신체 증상은 성욕감퇴 및 발기부전이며 현재까지 성욕감퇴 및 발기부전 개선 기능성은 인정된 사례가 없다. 또한 당사의 자회사인 엘파인과 삼성바이오텍(주)의 oem을 통해 제품 판매가 기준 30억원을 달성하였음.

따라서, 야관문을 활용한 성 활동 및 발기력 감소 개선을 위한 혈관이완 기능성 관련 R&D를 통하여 개별인정 등록 및 상업화 시 건강기능식품 시장에 커다란 파급효과가 확실 시 된다.

나. BM 목표 및 핵심경쟁요인

(1) BM 목표 및 핵심경쟁요인

국내 및 국외시장 분석결과 야관문제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 개별 인정형 원료로 인정받지 못하여 일반식품군으로 판매가 이뤄지고 있음. 본 연구과제에서는 야관문을 개별인정형 원료로 인정받는 연구 및 개발을 추진하여 국내최초 남성 갱년기에 도움을 줄 수 있는 제품 등을 생산하여 국내 및 국외시장에서 단일제품 매출 1,000억 이상의 제품을 개발할 예정임.

다. 목표 시장 구조

(1) 경쟁기업 현황

(가) 경쟁기업 현황 및 경쟁구조

<국내 유통 남성건강 관련 건강기능식품>

제품	내용
 한국야쿠르트 '미스터 10'	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 주원료 : MR-10 민들레등복합추출물</li> <li>- 남성호르몬 개선을 통한 남성갱년기에 도움.</li> </ul>
 'MR-10 미스터 맥스'	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 주원료 : MR-10 민들레등복합추출물</li> <li>- 남성호르몬 개선을 통한 남성갱년기에 도움.</li> </ul>
 CJ제일제당 '전립소 소팔메토'	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 주원료 : 소팔메토 열매 추출물</li> <li>- 전립선 건강에 도움.</li> </ul>

국내 남성건강 개별인정 건강기능식품은 MR-10 민들레등복합추출물을 주원료로 한 한국야쿠르트의 '미스터 10' 과 'MR-10 미스터 맥스' 2가지 제품이 있으나 현재 건강기능식품 시장에서는 크게 호응을 받지 못하고 있으며 소팔메토의 경우 14년도 기준 700억원의 매출성과를 이루었음. 소팔메토의 경우 남성 전립선에 도움을 줄 수 있는 제품이므로 당사가 개발하고자 하는 기능과는 별개이기 때문에 제품개발의 차별성이 높다고 볼 수 있다.

(2) 시장진입 장벽

라. 수익 확보 전략

(1) 주요 고객군

외국의 연구에 의하면 39~70세의 남성에서 혈중 유리 테스토스테론은 매년 1.2%씩 감소하고 반대로 남성 호르몬의 역할을 저하시키는 성 호르몬 결합 글로불린은 매년 1.2%씩 증가하는 것으로 알려져 있다. 남성 호르몬 결핍의 유병률에 대한 한 연구에 의하면 총 남성 호르몬을 기준으로 했을 때 40~60대에서 약 7%, 60~80대에서 약 21%, 80세 이상에서 약 35%이고 생체 활용 남성 호르몬을 기준으로 했을 때 40~49세에서 약 49%, 70세 이상에서 약 70%에서 남성 호르몬 결핍이 있다고 보고되었고 40대 이후 중장년층에게 국한되었던 갱년기 증상이 스마트폰 전자파, 식생활 변화 등 환경적 요인에 따라 호르몬 균형이 파괴되면서 젊은 층 환자 늘고 있음. 이에 따라 시장의 주요 고객군으로 30대 초반에서 50대까지를 타겟으로 선정하여 판매전략을 확보할 예정임.

(2) BM의 수익창출 방안

당사의 수익창출방안으로는 네추럴웨이 직영브랜드인 엘파인을 통한 매출액 증진 및 홈쇼핑 진출을 통한 매출실현, 현재 당사와 거래중인 대기업을 통한 oem,odm 형식을 통해 시장에 진출할 예정임. 뿐만 아니라 원료에 대한 판매를 통해 매출액의 극대화를 이를 예정.

	유통별		1차년도	2차년도	3차년도	비고
방문판매	엘파인(직영)		10	16	30	1차판매
홈쇼핑	회사별	GS홈쇼핑	20	30	50	1차판매
		CJ홈쇼핑				
		롯데홈쇼핑				
		NS홈쇼핑				
		홈앤쇼핑				
OEM ODM	대표유통브랜드	KGC	9	14	20	2차판매
		CJ제일제당				
		한국야쿠르트				
		제약사				
	할인매장	홈플러스				
		이마트				
		롯데마트				
대표약국유통	온누리건강약국체인					
원료판매						
계			39	60	100	

1차년도

개월	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월	7개월	8개월	9개월	10개월	11개월	12개월	계	매출단가	매출액
방문판매	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	36,000	30,000	1,080,000,00
홈쇼핑	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	5,000	5,000	5,000	6,000	6,000	6,000	51,000	40,000	2,040,000,00
oem	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	2,000	24,000	20,000	480,000,00
원료판매	100kg	100kg	100kg	100kg	100kg	100kg	100kg	100kg	100kg	100kg	100kg	100kg	1200kg	300,000/kg	360,000,00
계	7,100	7,100	7,100	7,100	7,100	7,100	11,100	11,100	11,100	12,100	12,100	12,100	112,200		3,960,000,00

2차년도

개월	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월	7개월	8개월	9개월	10개월	11개월	12개월	계	매출단가	매출액
방문판매	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	4,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	54,000	30,000	1,620,000,00
홈쇼핑	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000	6,000	7,000	7,000	7,000	7,000	7,000	7,000	78,000	40,000	3,120,000,00
oem	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	36,000	20,000	720,000,00
원료판매	150kg	150kg	150kg	150kg	150kg	150kg	150kg	150kg	150kg	150kg	150kg	150kg	1800kg	300,000/kg	540,000,00
계	13,150	13,150	13,150	13,150	13,150	13,150	15,150	15,150	15,150	15,150	15,150	15,150	169,800		6,000,000,00

3차년도

개월	1개월	2개월	3개월	4개월	5개월	6개월	7개월	8개월	9개월	10개월	11개월	12개월	계	매출단가	매출액
방문판매	7,000	7,000	7,000	7,000	7,000	7,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	10,000	102,000	30,000	3,060,000,00
홈쇼핑	8,000	8,000	8,000	8,000	8,000	8,000	13,000	13,000	13,000	13,000	13,000	13,000	126,000	40,000	5,040,000,00
oem	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	5,000	60,000	20,000	1,200,000,00
원료판매	200kg	200kg	200kg	200kg	200kg	200kg	200kg	200kg	200kg	200kg	200kg	200kg	2400kg	300,000/kg	720,000,00
계	20,200	20,200	20,200	20,200	20,200	20,200	28,200	28,200	28,200	28,200	28,200	28,200	290,400		10,020,000,00

붙임. 참고문헌

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.