

11-15430  
00-00276  
5-01

발간등록번호

11-1543000-002765-01

국내  
자생  
솔잎  
착즙  
분말  
을  
이  
용  
한  
체  
지방  
개선  
및  
건강  
기능  
식품  
개발

최  
종  
보  
고  
서

2019

농  
림  
축  
산  
신  
식  
품  
부

고  
부  
가  
가  
치  
식  
품  
기  
술  
개  
발  
사  
업  
R  
&  
D  
R  
e  
p  
o  
r  
t

국내 자생 솔잎착즙분말을  
이용한 체지방 개선 및  
건강기능식품 개발  
최종보고서

2019. 02. 08.

주관연구기관 / (주)셀인바이오  
협동연구기관 / 조선대학교산학협력단  
협동연구기관 / 경남대학교산학협력단

농  
림  
축  
산  
신  
식  
품  
부

<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국내 자생 솔잎착즙분말을 이용한 체지방 개선 및 건강기능식품 개발”  
(개발기간 : 2016. 07. 07. ~ 2018. 12. 31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 08.

주관연구기관명 : ㈜셀인바이오 (대표자) 안명옥  
협동연구기관명 : 조선대학교 산학협력단 (대표자) 김준성  
협동연구기관명 : 경남대학교 산학협력단 (대표자) 장재관

주관연구책임자 : 조 장 희  
협동연구책임자 : 정 현 숙  
협동연구책임자 : 박 은 주

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

### 보고서 요약서

과제고유번호	116010-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.07.07.~ 2018.12.31	단 계 구 분	3/3
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	국내 자생 솔잎착즙분말을 이용한 체지방 개선 및 건강 기능식품 개발			
연구책임자	조 장 회	해당단계 참여연구원 수	총: 19명 내부:   명 외부:   명	해당단계 연구개발비	정부:180,000천원 민간:60,000천원 계:240,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 29명 내부:   명 외부:   명	총 연구개발비	정부:520,000천원 민간:174,000천원 계:694,000천원
연구기관명 및 소속부서명	조선대학교 산학협력단 경남대학교 산학협력단			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명: (재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터			연구책임자: 방 미 애	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	공개				

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약

- 솔잎착즙분말의 체지방 개선 관련 지적 재산권 확보
- 솔잎 생산 농가와의 MOU 체결
- 솔잎착즙분말의 원료 표준화 수립
- 솔잎착즙분말의 안전성 입증자료 확보
- 솔잎착즙분말의 기준/규격 설정 및 안정성 평가 완료
- 솔잎착즙분말의 지표성분 결정 및 분석법 확립
- 솔잎착즙분말의 체지방 개선 및 혈압감소 전·임상 효능 검증
- 솔잎착즙분말의 개별인정형 기능성 원료 신청
- 솔잎착즙분말을 함유한 건강기능식품 제품 개발 및 상품화

보고서 면수

p 111

### < 요약 문 >

연구의 목적 및 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 솔잎착즙분말의 체지방 개선 전·임상 효능 분석</li> <li>• 솔잎착즙분말을 이용한 다양한 시제품 개발</li> <li>• 솔잎착즙분말의 ‘체지방 개선’ 개별인정획득 및 건강기능식품 개발                     <ul style="list-style-type: none"> <li>- 사업기간 3차년도 : 개별인정 신청 및 건강기능식품 솔잎착즙분말 시제품 개발과 일반식품 개발</li> <li>- 사업종료 3년 후 : 개별인정 획득 및 건강기능식품 솔잎착즙분말 제품 개발</li> </ul> </li> <li>• 솔잎착즙분말의 사업화</li> </ul>				
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 솔잎착즙분말의 체지방 개선 관련 지적 재산권 확보</li> <li>• 솔잎 생산 농가와의 MOU 체결</li> <li>• 솔잎착즙분말의 원료 표준화 수립</li> <li>• 솔잎착즙분말의 안전성 입증자료 확보</li> <li>• 솔잎착즙분말의 기준/규격 설정 및 안정성 평가 완료</li> <li>• 솔잎착즙분말의 지표성분 결정 및 분석법 확립</li> <li>• 솔잎착즙분말의 체지방 개선 및 혈압감소 전·임상 효능 검증</li> <li>• 솔잎착즙분말의 개별인정형 기능성 원료 신청</li> <li>• 솔잎착즙분말을 함유한 건강기능식품 제품 개발 및 상품화</li> </ul>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 솔잎의 원료 수급 및 제조공정 표준화 확립을 통한 안정적인 솔 잎 착즙분말 원료 공급</li> <li>• 솔잎착즙분말의 체중개선 및 혈압감소 효능 개별인정 신청 및 획득</li> <li>• 솔잎착즙분말의 체중개선 효능 및 혈압감소 효능 원료 판매 및 제품 개발</li> <li>• 국내 특허를 기반으로 해외 특허 등록</li> <li>• 건강기능식품 수입 원료에 대한 대체 효과</li> </ul>				
국문핵심어 (5개 이내)	항비만	건강기능식품	솔잎착즙분말	개별인정형	체지방개선
영문핵심어 (5개 이내)					

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

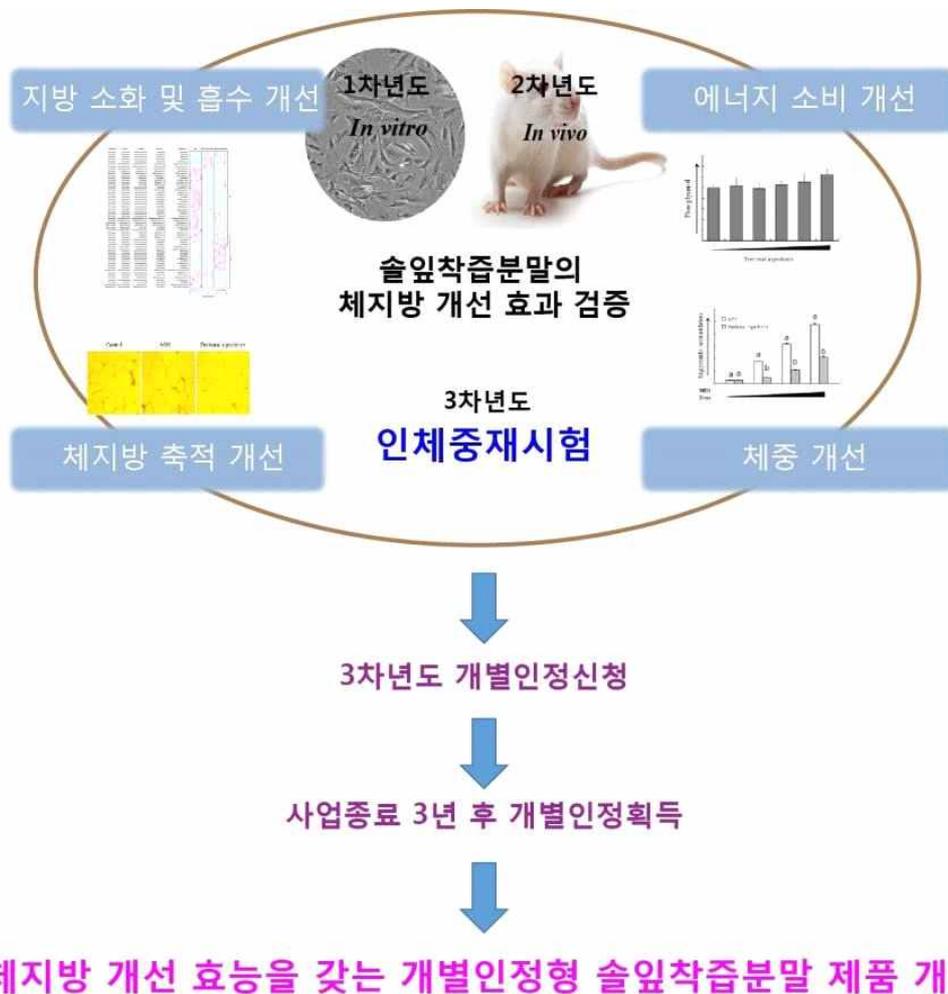
## < 목 차 >

제 1 장. 연구개발과제의 개요 .....	6
제1절. 연구개발의 목적 .....	6
제2절. 연구개발의 필요성 .....	6
제3절. 연구개발의 범위 .....	10
제 2 장. 연구수행 내용 및 결과 .....	11
제1절. 솔잎착즙분말 원료의 성분 및 시험 성적서 작성 .....	11
제2절. 솔잎착즙분말의 원료 표준화 및 제조 공정 표준화 .....	13
제3절. 솔잎착즙분말의 체지방 개선 효능 <i>In vitro</i> 연구 .....	37
제4절. 솔잎착즙분말의 체지방 개선 효능 <i>In vivo</i> 연구 .....	46
제5절. 솔잎착즙분말의 체지방 개선 기전 연구 .....	54
제6절. 임상시험을 통한 솔잎착즙분말의 체지방 개선 효능 검증 .....	58
제7절. 솔잎착즙분말의 안전성 평가 자료 확보 및 요약서 작성 .....	75
제8절. 체지방 개선 건강기능식품 시제품 및 일반 제품개발 .....	95
제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	99
제1절. 연도별 연구목표 및 달성도 .....	99
제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등 .....	105
제1절. 실용화 산업화 계획 .....	105
제2절. 기술확산 계획 .....	105
붙임. 참고 문헌 .....	107

# 제 1 장. 연구개발과제의 개요

## 제 1 절. 연구개발 목적

본 연구는 솔잎착즙분말로부터 체지방 개선효능을 확인하고 원료 표준화를 확립하며, 그 원료 물질에 대한 안전성 및 인체적용시험을 거쳐 개별인정형 소재로 등록하고 건강기능식품의 제품화를 추진하는 데 있다.



## 제 2 절. 연구개발의 필요성

### 요약

- ▷ 세계 비만 인구 증가
- ▷ 국내 비만 인구 증가
- ▷ 각 부처의 정책 방향이 경제 성장을 위해 고부가가치 산업을 육성·지원
- ▷ 체지방 축적과 질병 발생 위험 증가의 상관관계
- ▷ 기능성 원료 개발의 필요성 및 중요성

## 1. 세계 비만 인구 증가(세계비만기구 발표 자료, 경향신문 2015.10.11)

가. 2010년 기준 전 세계 비만 성인 인구는 6억 7000만 명 (성인 인구13%)이며 2025년 10억 명 증가 예측 (성인 인구 17%)

나. 40년 전보다 비만인구 6배로 급증하며 2025년에는 5명 중 1명은 비만(의학 학술지 란셋)

다. 과체중 인구 포함 시 비만 인구는 20억 3000만 명으로 예측되며 의학적 치료가 시급한 인구는 1억 7000만 명으로 예측

라. 세계 비만 인구의 증가 원인

- (1) 서구화된 식단
- (2) 개발도상국 (중동, 남미, 중국, 동남아)에 대한 글로벌 식품회사들의 공격적 마케팅
- (3) 앉아서 일하는 일자리 증가 및 운동 부족
- (4) 여러 국가가 빈곤에서 벗어나면서 건강에 좋지 않은 칼로리 섭취가 쉬워짐
- (5) 과일, 채소, 곡물 등 신선식품이 정제된 탄수화물보다 더 비싼 경우가 많음
- (6) 정제 탄수화물이나 건강에 좋지 않은 음식의 과소비를 피해야 함

바. 매년 전 세계에서 비만으로 사망하는 인구는 300만명 (비용 환산 : 2.323조원)

## 2. 국내 비만 인구 (BMI 25이상), 2014년 통계청

가. 2014년 기준 만 30세 이상 비만 인구는 32.9%로 2005년 이후 32~35% 수준을 유지

나. 지방 섭취량은 지속적으로 증가하고 있으며, 나트륨 섭취 과잉, 칼슘 섭취 부족은 여전

- (1) 에너지 섭취량은 매년 유사하지만 지방 섭취량은 '07년 이후 지속적으로 증가
- (2) 나트륨 섭취량은 '10년 이후 감소하고 있으나 일일 섭취량 이상 인구 80% 이상

다. 비만 인구의 증가 원인

- (1) 채식 위주에서 육식 위주의 식습관 변화
- (2) 경제성장과 동시에 인스턴트 식품 소비 증가
- (3) 잦은 야근과 불규칙한 식습관으로 인한 생활리듬 변화
- (4) 다양한 편의시설 증가로 인한 운동 부족

라. 국내 비만 인구 통계에서 만 30세 이상 인구 대상으로 18세~ 30세 미만 인구의 비만 조사 시 비만 인구는 증가할 것으로 예측

## 3. 정부 정책 방향

가. 중소기업 및 바이오 관련 2016년 정부 정책 방향

기획재정부	교육부	산업통상자원부
고부가가치 제품군 개발·투자 시 다양한 지원과 6차 산업 및 수출 활성화를 통한 새로운 성장 동력 창출과 경기 회복	일자리 창출을 위한 산학협력 활성화를 위한 연구 성과의 사업화 확대	국내 중소기업에 집중 지원하여 고부가 제품 개발을 통한 수출 기업 및 글로벌 기업으로 전환
(구)미래창조과학부	농림축산식품부	2016년 정책방향
지역 전략 산업 육성을 위한 민간 투자 유도, 규제완화, 지역 문화 기반 제품·관광 브랜드화 및 R&D 혁신을 통한 글로벌 강소 기업 육성과 중소기업을 지원하여 성장 동력 기반 마련	지역단위 6차 산업 지원 및 농산물 제조·가공 활성화를 통한 농촌경제 활성화 및 식품 산업 육성	각 부처는 내수경기 및 수출 활성화를 위해 중소기업 육성과 다양한 R&D를 지원할 계획임

- 나. 각 부처의 정책 방향은 경제 성장을 위해 고부가가치 산업을 육성·지원
- 다. 기획재정부와 농림축산식품부는 고부가가치 제품 개발과 문화를 융합하여 6차 산업을 통해 성장 동력을 창출하여 경기 회복에 노력
- 라. 과학기술정보통신부((구)미래창조과학부), 교육부와 산업통상자원부는 연구 성과를 사업화로 확대하기 위해 산학 협력을 진행하며 과학기술정보통신부는 국제 시장에서 통하는 기업 육성과 중소기업 지원을 통해 성장 동력을 이끌려고 계획함
- 마. 각 부처는 경기 침체를 극복하기 위해 중소기업과 다양한 R&D 지원을 통해 고부가가치 산업을 창출하여 내수 경기 회복과 수출 활성화를 통해 경제 성장을 이끌려고 계획함

#### 4. 체지방 감소의 중요성

- 가. 지방은 인체의 필수적인 구성성분으로, 중요한 열량원이며 체내 중요 물질의 전구체이기도 함. 체지방은 식품을 통해 섭취되거나 간 등에서 합성됨
- 나. 체지방이 필요이상으로 축적되면 비만이 되고 이로 인해 당뇨병, 심혈관계질환 등의 질병 발생 위험이 높아짐



- 다. 과도하게 축적된 체지방을 감소시키면 혈압이 낮아짐

- 라. 인슐린 저항성이 감소됨
- 마. 혈중 지질이 개선됨
- 바. 혈전 생성이 감소됨
- 사. 각종 염증 지표들이 낮아짐
- 아. 다양한 생리활성 지표들의 개선으로 사망률이 낮아짐

## 5. 기능성 원료 개발의 필요성 및 중요성

- 가. WHO는 비만은 “ 21C 신중 전염병”으로 규정함. 비만 건강기능식품 개발의 필수적임
- 나. 급성장하고 있는 비만 시장에 대해 비만과 비만관련 대사질환을 치료할 약물과 건강기능성 식품 개발이 필수적임
- 다. 바이오푸드네트워크 사업보고서(2007)에 의하면 기업에서는 우선 연구 분야로 1위 비만, 2위 면역기능, 3위 고지혈증, 4위 당뇨 등으로 조사됨
- 라. 소비자 대상 조사에서 건강기능식품 기능성 우선순위로 비만이 1위로 나타남. (한국건강기능식품협회)
  - 국내 기업은 이익창출을 위해 소비자들은 삶의 질을 개선하기 위해 비만 기능성 제품을 요구하고 있음
- 마. 국내·외 건강기능식품 시장의 환경변화
  - (1) 건강에 대한 관심 증가. 삶의 질 향상, 인구 고령화에 따른 만성질환 증가와 질병의 치료에서 예방 개념 전환은 건강기능식품의 사회적 필요성과 수요 증가로 국내·외 시장 성장
  - (2) 경제성장으로 인한 젊은 층에서는 채식위주에서 육식위주로 식습관 변화와 다양한 인스턴트 제품의 출현과 패스트푸드 업체 증가로 과체중 인구 증가. 중장년층이상에서는 업무 시장 연장과 잦은 회식으로 인한 과체중 및 비만 인구 증가
  - (3) 젊은 층에서는 미용 목적으로 체중 관리에 대한 관심 증가로 헬스클럽, 다이어트 식품과 건강기능식품에 대한 관심 증가. 중장년층 이상에서는 비만으로 인한 당뇨, 심혈관계질환으로 인한 비만 치료제와 건강기능식품에 대한 관심 증가로 관련 매출 증가
  - (4) 2002년 본 가이드라인 (Bonn Guideline)과 2010년 나고야 의정서 채택, FTA 등으로 국내제품 원가 상승
    - (가) 한-미, 한-중 FTA 체결
    - (나) 생물 다양성 협약 제 10차 ‘유전자원 접근 및 이익분배 (ABS)
    - (다) 국내 건강기능식품 대부분 원료는 수입에 의존하고 있음
      - 나고야 의정서 채택으로 인한 로열티는 물론 매출의 일정 부분을 주 생물소재의 원산지 해당 국가에 지불해야 하며, 이는 가격 상승은 물론 경쟁력 하락으로 연결될 수 있음.
    - (라) 국내 대표 기능성 소재 및 브랜드 발굴을 위한 R&D 지원이 필요함
      - 해외 수출용 제품의 생산액과 생산량은 매년 증가하고 있지만 홍삼, 프로바이오틱스를 제외하고 국내 대표 브랜드가 거의 없음

- 건강기능식품 인·허가 획득 시까지 많은 예산이 필요
- 국내 자생 식물을 이용한 전·임상 연구가 필요함

### 제 3 절. 연구개발 범위

구 분	연 도	연구개발의 목표	연구개발의 내용
1차년도	2016	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 솔잎착즙분말 원료의 성분 및 시험 성적서 작성</li> <li>○ 솔잎착즙분말의 원료 및 제조 공정 표준화</li> <li>○ 솔잎착즙분말의 체지방 개선 효능 <i>In vitro</i> 연구</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 솔잎착즙분말의 시험성적서 결과 및 증빙 자료 분석</li> <li>○ 솔잎착즙분말에서 체지방 개선에 관여하는 기능성 물질 설정</li> <li>○ 솔잎착즙분말의 규격화를 위한 지표 물질의 설정</li> <li>○ 솔잎착즙분말의 생산조건 확립을 위한 제조 공정의 확립</li> <li>○ 지방 소화흡수 : Pancreatic lipase 활성 분석</li> <li>○ 체지방 축적 : 3T3-L1 지방전구세포를 이용한 지방분화 억제 분석</li> <li>○ 에너지 소비 : 3T3-L1 지방전구세포를 이용한 지방 분해 분석</li> <li>○ 에너지 대사 조절 : 3T3-L1 지방전구세포에서 DNA 발현분석</li> </ul>
2차년도	2017	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 솔잎착즙분말의 안전성 평가 자료 확보 및 요약서 작성</li> <li>○ 솔잎생산 농가(영농조합) 및 유통업체와의 MOU체결</li> <li>○ 솔잎 착즙분말의 체지방 개선 효능 <i>In vivo</i> 연구</li> <li>○ 임상시험을 통한 솔잎 착즙분말의 체지방 개선 효능 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 안전성 평가 의사결정도에 따른 솔잎착즙분말의 안전성 평가</li> <li>○ 솔잎착즙분말에 대한 섭취량 평가 자료 확보</li> <li>○ 솔잎착즙분말에 대한 안전성 자료 확보</li> <li>○ 영양평가자료 분석 및 요약서 작성</li> <li>○ 고지방식이 동물모델을 이용한 솔잎착즙분말의 체지방 감소 효능 검증 : 체중, 식이 섭취량, 식이효율, 혈액 분석, 장기 무게 측정</li> <li>○ IRB 심의 신청</li> <li>○ 인체적용시험 진행 : 인체적용시험 대상자 (BMI 25이상 30미만) 모집</li> <li>○ 인체적용시험 대상자들의 스크리닝 : 신체계측치(Inbody, DEXA), 혈압, 혈당 분석</li> </ul>
3차년도	2018	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 인체중재시험 원료를 이용한 체지방 개선 건강기능식품 시제품 개발</li> <li>○ 솔잎착즙분말을 이용한 일반 제품 개발</li> <li>○ 체지방 개선에 대한 솔잎착즙분말의 개별인정 신청</li> <li>○ 솔잎착즙분말의 <i>In vitro</i> 및 <i>In vivo</i>에서 체지방 개선 기전 연구</li> <li>○ 임상시험을 통한 솔잎착즙분말의 체지방 개선 효능 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 시제품의 제형 및 제품 개발</li> <li>○ 시제품의 영양성분 함량 및 품질관리 기준확립</li> <li>○ 일반 제품 개발 및 유통 판매</li> <li>○ 솔잎착즙분말의 체지방 개선 작용 기작 규명</li> <li>○ 체지방 개선에 대한 솔잎착즙분말의 개별 인정 신청_식품의약품안정처</li> <li>○ 비만대사 및 항산화 대사 개선 효능과 솔잎착즙분말의 생체 이용률 분석</li> </ul>

## 제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 솔잎착즙분말 원료의 성분 및 시험 성적서 작성

#### 1. 솔잎착즙분말 원료의 영양성분분석

- 가. 검사항목 : 열량, 탄수화물, 당류, 단백질, 지방, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤, 나트륨
- 나. 시험검사기관명 : 창녕양과장류연구소
- 다. 시험방법 : 식품공전 제9. 일반시험법 1.식품성분시험법 1.일반성분시험법
- 라. 시험결과

성분	함량	성분	함량
열량(Kcal/100g)	398.2	수분(g/100g)	1.1
탄수화물(g/100g)	79.7	회분(g/100g)	2.6
지방(g/100g)	2.6	나트륨(mg/100g)	21.5
단백질(g/100g)	14.0	포화지방(g/100g)	0.8
트랜스지방(g/100g)	0.0	콜레스테롤(mg/100g)	0.4

#### 2. 솔잎착즙분말 원료의 잔류농약검사

- 가. 검사항목 : 알드린(Aldrin) 외 (319성분)
- 나. 시험검사기관명 : 창녕양과장류연구소
- 다. 시험방법 :
  - (1) 농산물 등에 유해물질 분석법 1.잔류농약 1.GC 및 LC를 이용한 다 성분 동시분석법
  - (2) 농산물 등에 유해물질 분석법 1.잔류농약 2.QuEChERS와 LC/MS/MS를 이용한 다 성분 동시분석법
  - (3) 시험결과 : 불검출

#### 3. 솔잎착즙분말 원료의 미생물검사

- 가. 검사항목 : 세균수, 대장균군수, 바실러스세레우스, 황색포도상구균, 리스토타 모노사이토제네스, 클로스트리디움 퍼프린젠스
- 나. 시험검사기관명 : 창녕양과장류연구소
- 다. 시험방법 :
  - (1) 식품공전 9.일반시험 3.미생물시험법 5. 세균수
  - (2) 식품공전 9.일반시험 3.미생물시험법 7. 대장균군
  - (3) 식품공전 9.일반시험 3.미생물시험법 12. 황색포도상구균
  - (4) 식품공전 9.일반시험 3.미생물시험법 14. 클로스트리디움 퍼프린젠스
  - (5) 식품공전 9.일반시험 3.미생물시험법 15. 리스토타 모노사이토제네스
  - (6) 식품공전 9.일반시험 3.미생물시험법 18. 바실러스세레우스
- 라. 시험결과 : 불검출

#### 4. 솔잎착즙분말 원료의 중금속검사

가. 검사항목 : 납, 카드뮴, 비소, 수은

나. 시험검사기관명 : 바이오푸드랩

다. 시험방법 : 식품공전 9.일반시험 7.식품 중 유해물질시험법 1.중금속시험

라. 시험결과

##### ■ 시험성적서 요약

성분 실측치	납(mg/kg)	카드뮴(mg/kg)	비소(mg/kg)	수은(mg/kg)
Lot No 1.	0.59	0.2	0.18	0.02
Lot No 2.	0.53	0.16	0.13	0.02
Lot No 3.	0.41	0.17	0.06	0.02

##### ■ 중금속의 1일 노출량

중금속명	실측치 <sup>a)</sup> (mg/kg)	최대 섭취량 <sup>b)</sup> (g)	제안규격 <sup>c)</sup> (µg/g)	제안규격에 의한 일일 최대섭취량 <sup>d)</sup> (µg)	규정규격 (µg)
납	0.51	3	3	9	10.8
총비소	0.09		1	3	150
카드뮴	0.18		1	3	3.0
총수은	0.02		0.5	1.5	2.1

<sup>a)</sup>실측치 : 바이오푸드랩(시험기관명) 3LOT 실측치의 평균값

<sup>b)</sup>최대섭취량 : 신청원료 1일 최대섭취량 3 g/일로 설정

<sup>c)</sup>제안규격 : 신청인이 제안한 규격

<sup>d)</sup>제안규격에 의한 일일최대섭취량 :  $b \times c$

#### 5. 솔잎착즙분말 원료의 이물검사

가. 검사항목 : 이물

나. 시험검사기관명 : 창녕양과장류연구소

다. 시험방법 : 식품공전 9.일반시험 2.이물

라. 시험결과 : 불검출



선별 1 순위	선별 2 순위
(+)-catechin	icariside E4
p-coumaric acid (isomer 3종)	cupressoside A
Quercetin	schizandriside
Shikimic acid	(+)-isolariciresinol
Protocatechuic acid	5,7,8,4'-tetrahydroxy-3-methoxy-6-methylflavone 8-O-β-D-glucopyranoside
quercetin 3-O-β-D-glucopyranoside	ferulic acid
Rutin	vanillic acid
Kaempferol	caffeic acid
	α-pinene
	β-pinene
	camphene
	choline

그림 2. 문헌조사를 통한 솔잎착즙분말의 유효성분 후보 물질

## 2. 솔잎착즙분말의 지표성분 및 기능성분 설정

가. 본 연구에서 솔잎착즙분말의 지표성분 및 기능성분으로 Shikimic acid와 Quercetin, Kaempferol을 설정하였고, 추가적으로 Coumaric acid, Vanillic acid, Ferulic acid, Catechin에 대한 분석도 진행함

나. Shikimic acid는 퀴산의 불포화 유도체로 식물이나 미생물의 중요한 생화학 반응 중간체임. 주로 항염, 진통 작용이 있으며, 항플루성 약물과 항암제의 중간체로 사용됨

다. Quercetin은 식물에서 발견되는 바이오플라보노이드의 일종으로 항산화, 항염증, 항혈소판, 항혈전, 항알레르기 작용 등 다양한 약리효과가 있는 것으로 알려져 있고, Kaempferol의 경우 플라보놀 배당체로 채소나 허브류 등에 널리 분포하며 지방과 DNA의 산화위험을 막고 강한 항산화작용을 하며 암세포 형성을 억제하는 화학적 예방 작용제로서 알려짐

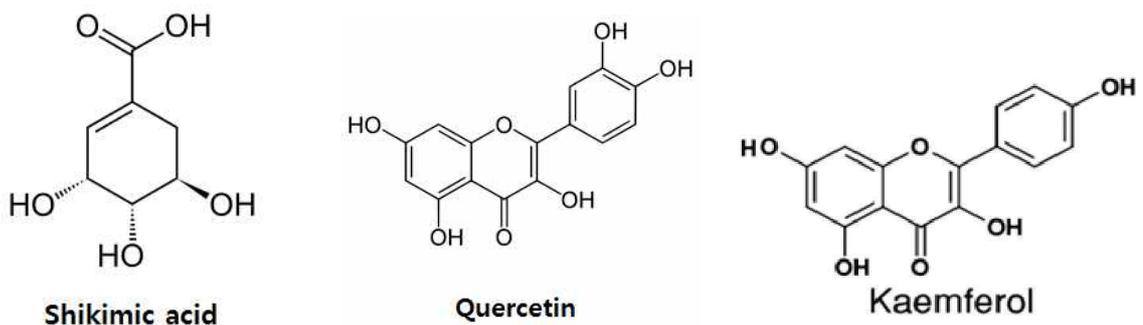


그림 3. 솔잎착즙분말의 지표물질 및 기능성분 후보물질

라. Coumaric acid, Vanillic acid, Ferulic acid 분석

(1) 실험방법

- (가) Coumaric acid, Vanillic acid 및 Ferulic acid 동시분석 : Coumaric acid, Vanillic acid, Ferulic acid 표준품을 동시분석 하기 위해 각 150, 300, 300ug/ml로 만들어서 세가지 표준품을 혼합하여 준비했다. 혼합된 용액을 각각 1/2씩 희석하여 준비함(50, 100, 100 / 25, 50, 50 / 12.5, 25, 25ug/ml)
- (나) 용액은 0.45um 필터로 여과 후에 사용하였다. 각각 솔잎착즙분말을 100% MeOH로 녹여 용액을 사용함. 각 용액을 Vortex mixer로 한 후에 13,000rpm에서 15분 원심분리하고 0.45um 필터로 여과 후 분석함
- (다) HPLC 분석조건

Table 1. Condition of HPLC analysis.

Column	Zorbax extend-C18 Analytical(4.6X150mm, 5um)		
Column temperature	25°C		
Flow rate	0.8ml/min		
Mobile phase	A : 0.2% phosphoric acid		
	B : ACN(Acetonitrile)		
Gradient	Time(min)	A(%)	B(%)
	0	90	10
	7	90	10
	8	80	20
	20	75	25
	21	0	100
	35	90	10
30	90	10	
Injection volumn	10ul		

(2) 실험결과

- (가) Coumaric acid, Vanillic acid 및 Ferulic acid 분석 : 솔잎 착즙 분말에서의 Coumaric acid, Vanillic acid 및 Ferulic acid 함량을 측정해 본 결과, 솔잎 착즙 분말의 Standard와 비슷한 시간대의 Spectrum과 일치 하지 않음
- (나) Coumaric acid : 12.5~100 μg/ml의 단계적으로 희석한 표준용액을 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였으며 그림 4와 같은 검량선을 나타냄. Coumaric acid의 검량선의 상관계수(R<sup>2</sup>)는 0.9998로 높은 직선성을 나타냄 (y=29753x-31058).

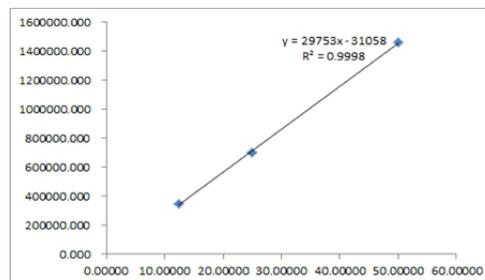


그림 4. Calibration curve (Coumaric acid).

- ① 정확성 : 정확성 (Accuracy)은 일내분석 (Intra-day)의 변이성을 측정함
- ② 표준용액 12.5 μg/ml, 25 μg/ml, 50 μg/ml로 혼합 조제하여 Intra-day에서 HPLC 분석의 재현성을 확인함. 정확성은 조제한 세 농도의 표준품을 3회 반복 측정하여 결

과 값이 참 값에 근접한 정도를 백분율로 나타냄. Intra-day의 정확성은 하루 동안 표준용액을 1일 3구간에서 분석하였으며 그 변이성을 측정함

- ③ 정확성 결과는 Table 2.와 같이 Coumaric acid의 Intra-day 분석에서는 회수율이  $100.25 \pm 0.128\%$ 를 확인함

Table 2. 정확성(Coumaric acid)

STD	이론값 (ug/ml)	이론값 보정농도 (ug/mL)	Peak Area	참값 (ug/ml)	회수율 (%)	Difference (%)	SD	CV(RSD)
1	12.50	12.50	347652	12.7	101.8	0.031	1067.888	0.307978
			347006	12.7	101.7	0.009		
			345566	12.7	101.3	0.040		
			평균값	12.70	101.58	0.026		
			표준편차	0.036	0.287	0.016		
2	25.00	25.00	711145	24.9	99.8	0.242	6707.145	0.9528
			702800	24.7	98.7	0.038		
			697877	24.5	98.0	0.204		
			평균값	24.703	98.813	0.161		
			표준편차	0.225	0.902	0.108		
3	50.00	50.00	1455507	50.0	99.9	0.136	7633.773	0.523026
			1454766	49.9	99.9	0.160		
			1468343	50.4	101.3	0.296		
			평균값	50.099	100.368	0.197		
			표준편차	0.257	0.808	0.086		

	회수율(%)	Difference(%)	RSD%
전체 평균값	100.25	0.128	
전체 표준편차	1.354	0.105	
표본의 크기	9	9	
95% 신뢰구간	99.21	101.2	0.0479
		9	0.2088

- (다) Vanillic acid : 25~100  $\mu\text{g/ml}$ 의 단계적으로 희석한 표준용액을 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였으며 그림 5와 같은 검량선을 나타냄. Vanillic acid의 검량선의 상관 계수( $R^2$ )는 0.9998로 높은 직선성을 나타냄( $y=34476x - 81054$ )

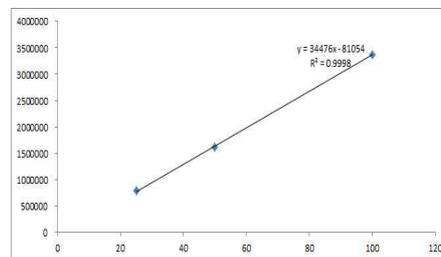


그림 5. Calibration curve(Vanillic acid)

- ① 정확성 : 정확성(Accuracy)은 일내분석(Intra-day)의 변이성을 측정하였다. 표준용액 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ 로 혼합 조제하여 Intra-day에서 HPLC 분석의 재현성을 확

인하였다. 정확성은 조제한 세 농도의 표준품을 3회 반복 측정하여 결과 값이 참 값에 근접한 정도를 백분율로 나타냄. Intra-day의 정확성은 하루 동안 표준용액을 1일 3구간에서 분석하였으며 그 변이성을 측정함

② 정확성 결과는 Table 3.과 같이 Vanillic acid의 Intra-day 분석에서는 회수율이  $100.18 \pm 0.235\%$ 를 나타냄

Table 3. 정확성 (Vanillic acid)

STD	이론값 (ug/ml)	이론값 보정농도 (ug/ml)	Peak Area	참값 (ug/ml)	회수율 (%)	Difference (%)	SD	CV(RSD)
1	25.00	25.00	795549	25.4	101.7	0.064	2701.338	0.340498
			794164	25.4	101.5	0.024		
			790334	25.3	101.1	0.087		
			평균값	25.36	101.45	0.058		
			표준편차	0.078	0.313	0.032		
2	50.00	50.00	1635332	49.8	99.6	0.330	10124.973	0.623474
			1620631	49.4	98.7	0.097		
			1615921	49.2	98.4	0.233		
			평균값	49.456	98.911	0.220		
			표준편차	0.294	0.587	0.117		
3	100.00	100.00	3362912	99.9	99.9	0.286	1656.044	0.0491
			3360570	99.8	99.8	0.354		
			3394821.0	100.8	100.8	0.640		
			평균값	100.181	100.181	0.426		
			표준편차	0.555	0.555	0.188		

	회수율(%)	Difference(%)	RSD%
전체 평균값	100.18	0.235	
전체 표준편차	1.182	0.195	
표본의 크기	9	9	
95% 신뢰구간	99.27	101.09	0.0849
			0.3848

(라) Ferulic acid : 25~100  $\mu\text{g/ml}$ 의 단계적으로 희석한 표준용액을 HPLC로 분석하여 검량선을 작성하였으며 그림 6과 같은 검량선을 나타냄. Ferulic acid의 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 0.9998로 높은 직선성을 나타냄 ( $y=42353x - 39673$ )

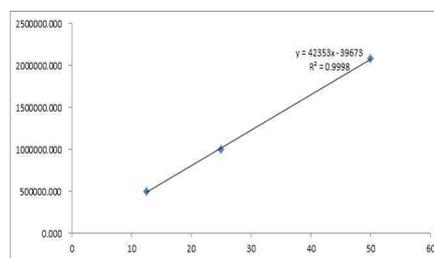


그림 6. Calibration curve(Ferulic acid)

- ① 정확성 : 정확성(Accuracy)은 일내분석(Intra-day)의 변이성을 측정함. 표준용액 25  $\mu\text{g/ml}$ , 50  $\mu\text{g/ml}$ 로 혼합 조제하여 Intra-day에서 HPLC 분석의 재현성을 확인함. 정확성은 조제한 세 농도의 표준품을 3회 반복 측정하여 결과 값이 참 값에 근접한 정도를 백분율로 나타냄. Intra-day의 정확성은 하루 동안 표준용액을 1일 3구간에서 분석 하였으며 그 변이성을 측정함.
- ② 정확성 결과는 Table 4.과 같이 Ferulic acid의 Intra-day 분석에서는 회수율이 134.12 $\pm$ 0.259%를 보였다.

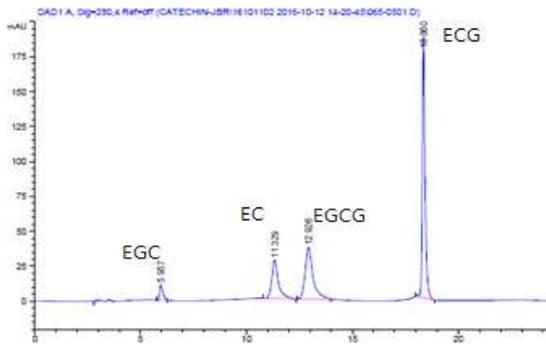
Table 4. 정확성(Ferulic acid)

STD	이론값 (ug/ml)	이론값 보정농도 (ug/ml)	Peak Area	참값 (ug/ml)	회수율 (%)	Diffenence (%)	SD	CV(RSD)
1	12.50	12.50	498352	25.4	203.6	0.022	1971.216	0.395923
			499569	25.5	204.1	0.079		
			495713	25.3	202.6	0.102		
			평균값	25.43	203.42	0.068		
			표준편차	0.093	0.741	0.041		
2	50.00	50.00	1016391	49.8	99.6	0.444	8627.119	0.856757
			1004985	49.3	98.5	0.092		
			999476	49.0	98.0	0.351		
			평균값	49.360	98.719	0.296		
			표준편차	0.406	0.811	0.182		
3	100.00	100.00	2083022	99.9	99.9	0.265	1371.787	0.065678
			2081082	99.9	99.9	0.356		
			2101865	100.8	100.8	0.621		
			평균값	100.213	100.213	0.414		
			표준편차	0.540	0.540	0.185		

	회수율(%)	Differece(%)	RSD%
전체 평균값	134.12	0.259	
전체 표준편차	51.982	0.201	
표본의 크기	9	9	
95% 신뢰구간	94.16	174.07	0.1046
			0.4139

(마) Catechin : 솔잎착즙분말에서의 Catechin 함량을 측정해 본 결과, 솔잎착즙분말의 Catechin Standard와 비슷한 시간대의 Spectrum을 비교해 보았으나 일치하지 않으므로 나타냄(그림 7과 그림 8)

(A) Standard 분석



(B) 슬임 착즙 분말

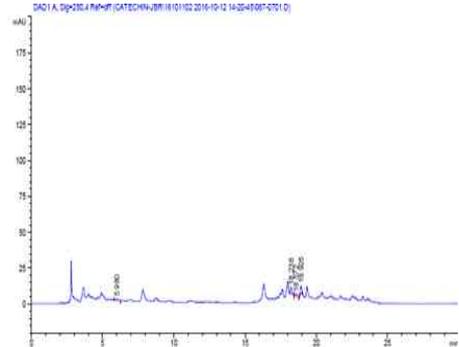


그림 7. Analysis of Catechin of pine needle extract powder.

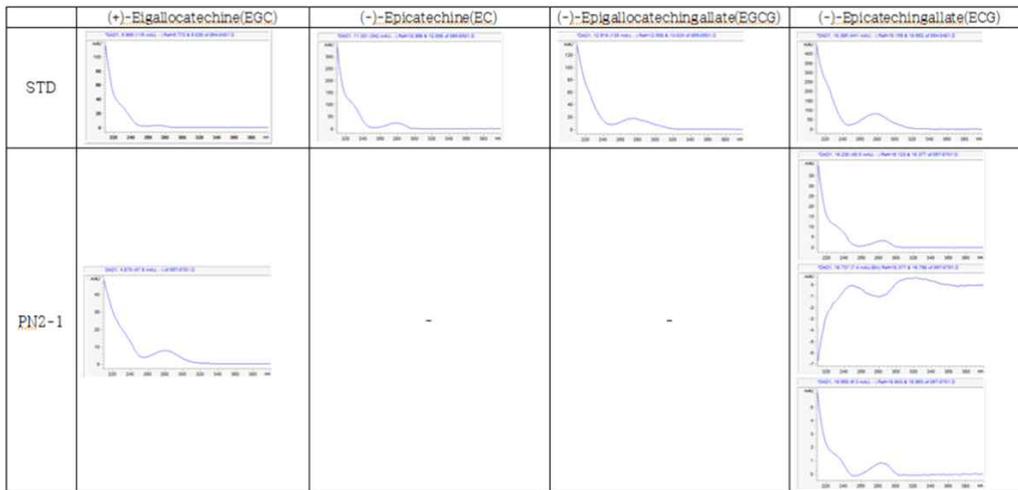


그림 8. Analysis of Catechin spectrum of pine needle juice powder.

#### 나. Quercetin, Kaempferol 분석

##### (1) 실험방법

- (가) 표준품 Quercetin과 Kaempferol은 Sigma(USA)사, Acetonitrile과 Methanol은 J.T.Baker(USA)사 제품을 사용하였고, Formic acid는 Sigma(USA)사 제품을 사용하였함.
- (나) 분석에 사용한 장비는 LC/MSMS(Triple QUAD 4500, AB SCIEX, USA), Sonicator(Powersonic 420, 화신테크)을 사용함
- (다) 분말 시료는 1mg을 취하여 Tube에 넣고, 80% Methanol을 1ml 넣은 후, Vortexing하여 Sonicator에서 1시간 추출함. 추출된 시료를 0.45um syringe filter로 여과하여 LC/MSMS로 분석함. 분석조건은 아래 Table 5.와 같음.

Table 5. Condition of analysis of HPLC(A) and MSMS(B).

A. HPLC

Column	C18 1.8um 50×2mm		
Column temperature	25°C		
Flow rate	0.4 mL/min		
Mobile phase	A : 0.1% Formic acid		
	B : Acetonitrile		
Gradient	Time(min)	A(%)	B(%)
	0	90	10
	2	15	85
	6	15	85
	10	90	10
	12	90	10
Injection volume	10 µL		

B. MSMS

Mode	[M-H] <sup>-</sup>	
	Q1MS	Product Ion MS2
Quercetin	301	151
Kaempferol	285	187
Declustering Potential(DP)	80	
Entrance Potential(EP)	10	
Collision Energy(CE)	-28(Quercetin), -46(Kaempferol)	
Collision Cell Exit Potential(CXP)	12	
Source/Gas & Parameters	Ion Source	Turbo Spray
	Curtain Gas(CUR)	10
	Collision Gas(CAD)	9
	Ion Spray Voltage(TEM)	-4500
	Temperature(TEM)	650
	Ion Source Gas 1 (GS1)	55
	Ion Source Gas 1 (GS2)	45

(2) 실험결과

- (가) Quercetin, Kaempferol 분석 : 솔잎착즙분말에서의 Quercetin과 Kaempferol의 정량 분석 결과 Quercetin의 함량의 경우 높게는 240.042ug/ml, 낮게는 8.952ug/ml의 함량을 보였고, Kaempferol의 함량은 1.947~157.427ug/ml을 확인함
- (나) Quercetin의 함량과 Kaempferol의 상관관계는 Quercetin의 함량이 높은 batch의 시료는 Kaempferol의 함량도 높게 나왔고, Quercetin의 함량이 낮은 batch의 시료는 Kaempferol의 함량도 낮게 나타남.
- (다) 솔잎착즙분말 시료에 따라 각각 결과가 상이한 이유는 착즙한 솔잎 원료의 변수, 즉 솔잎 원료의 채취 시기, 채취 장소 등 원료의 차이에서 발생한 것으로 사료 됨

(라) Quercetin

Table 6. Calibration of Standard Compound(High concentration).

Concentration(ng/ml)	R.T(min)	Area
10	3.5	369000
20		641000
50		1480000
100		2760000
200		5370000

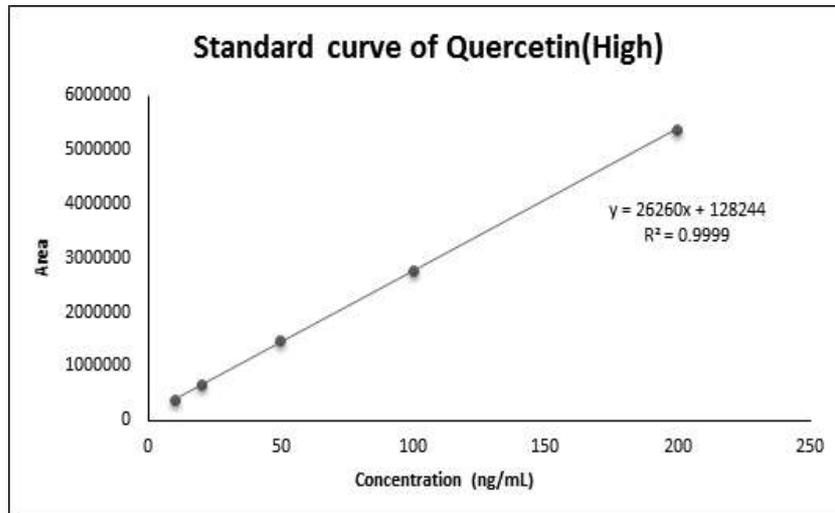
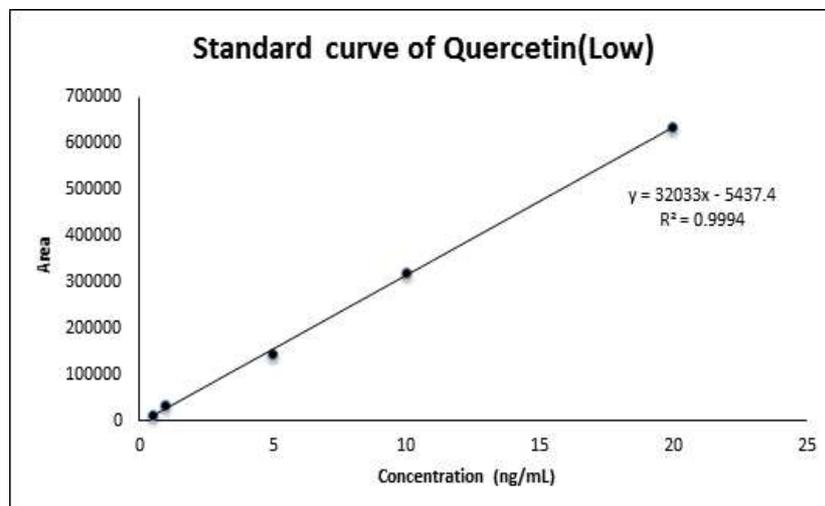
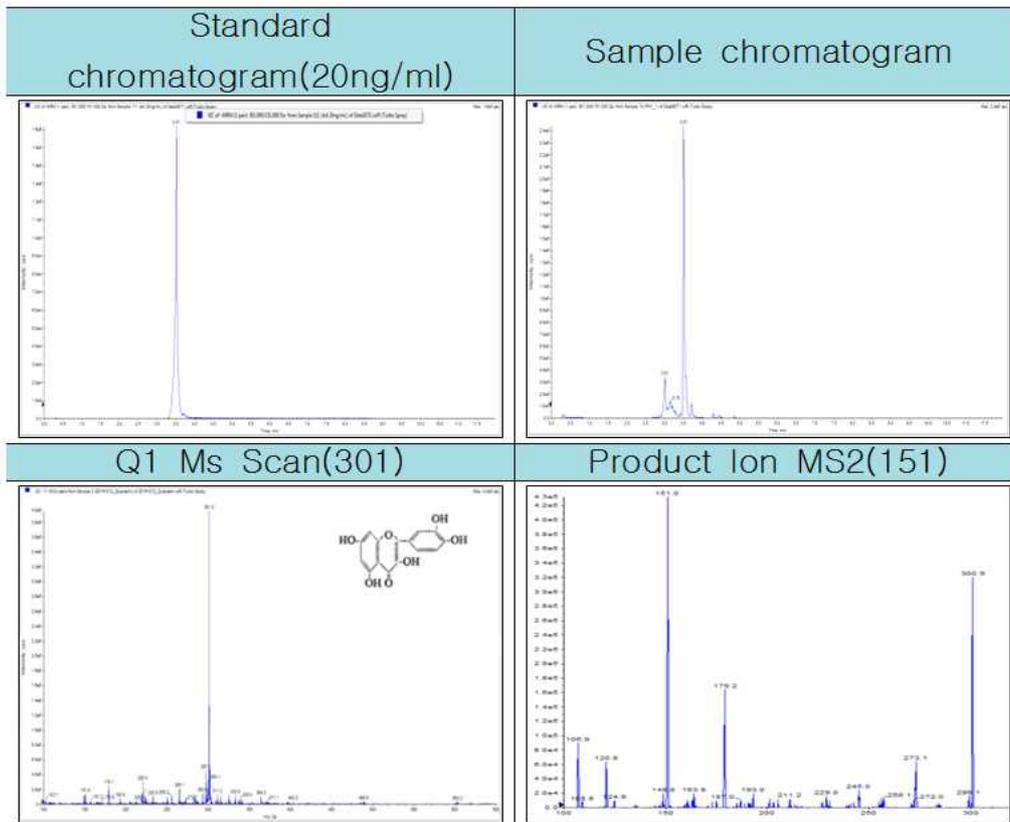


Table 7. Calibration of Standard Compound(Low concentration).

Concentration(ng/ml)	R.T(min)	Area
0.5	3.5	10700
1		33300
5		144000
10		318000
20		636000



○ Chromatogram of Standard and Sample



○ Measured Quercetin Concentration : 솔잎착즙분말의 각 Batch별 Quercetin의 함량을 정량해 본 결과, 8.952~240.042ug/ml로 각각 상이한 Quercetin 함량을 보임.

Sample	Area	Concentration (ng/ml)	정용	희석배수	Concentration (ng/ml)	ug/ml	Average (ug/ml)
PN1	3190000	116.594	1	2	233187.814	233.188	<b>240.042</b>
	3330000	121.925	1	2	243850.419	243.850	
	3320000	121.544	1	2	243088.804	243.089	
PN2	2360000	84.987	1	2	130749.077	130.749	<b>131.335</b>
	2370000	85.368	1	2	131334.935	131.335	
	2380000	85.749	1	2	131920.792	131.921	
PN3	380000	12.033	1	1	12032.510	12.033	<b>12.324</b>
	399000	12.626	1	1	12625.649	12.626	
	389000	12.313	1	1	12313.470	12.313	
PN4	364000	11.533	1	1	11533.025	11.533	<b>11.658</b>
	358000	11.346	1	1	11345.718	11.346	
	382000	12.095	1	1	12094.946	12.095	
PN5	2500000	90.318	1	2	164214.914	164.215	<b>166.984</b>
	2580000	93.365	1	2	169753.929	169.754	
	2540000	91.841	1	2	166984.422	166.984	
PN6	284000	9.036	1	1	9035.601	9.036	<b>8.952</b>
	286000	9.098	1	1	9098.036	9.098	
	274000	8.723	1	1	8723.423	8.723	

\*PN1~6 : Batch별 솔잎 착즙 분말

(4) Kaempferol

Table 8. Calibration of Standard Compound(High concentration).

Concentration(ng/ml)	R.T(min)	Area
5	3.69	78200
10		112000
20		183000
50		373000
100		676000

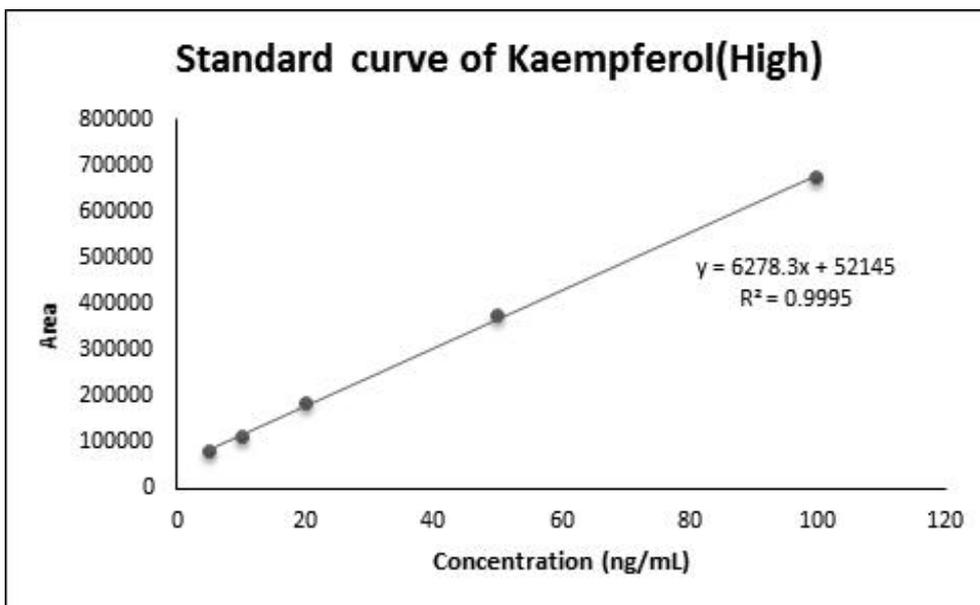
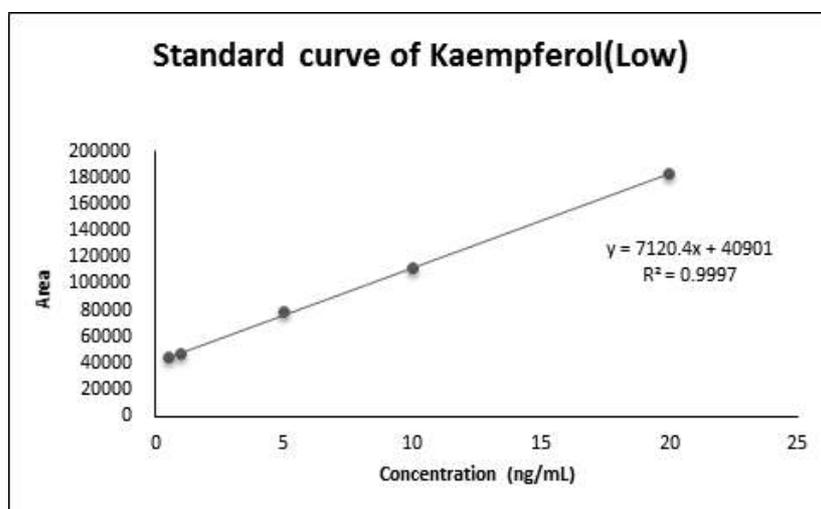
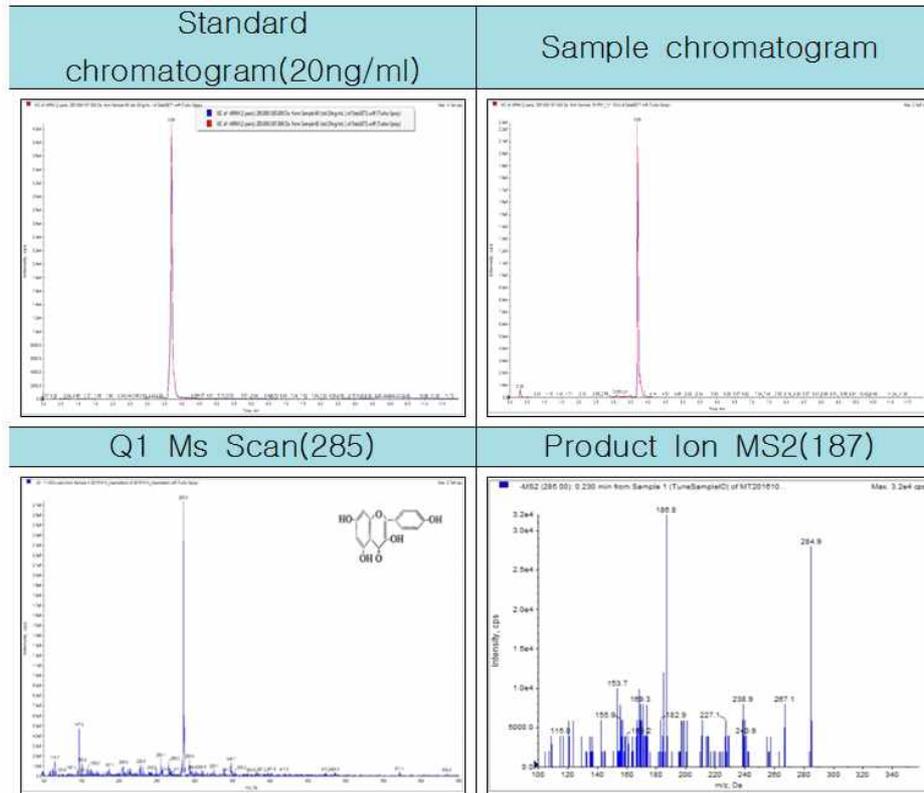


Table 9. Calibration of Standard Compound(Low concentration).

Concentration(ng/ml)	R.T(min)	Area
0.5	3.69	31900
1		34900
5		61700
10		91300
20		153000



○ Chromatogram of Standard and Sample



○ Measured Kaempferol Concentration : 솔잎착즙분말의 각 Batch별 Kaempferol의 함량을 정량해 본 결과, 1.947~157.427ug/ml로 Quercetin과 같이 각각 상이한 함량을 보였다.

Sample	Area	Concentration (ng/ml)	정용	희석배수	Concentration (ng/ml)	ug/ml	Average (ug/ml)
PN1	541000	77.864	1	2	155728.462	155.728	<b>157.427</b>
	548000	78.979	1	2	157958.365	157.958	
	550000	79.298	1	2	158595.480	158.595	
PN2	330000	44.256	1	2	68086.780	68.087	<b>65.881</b>
	308000	40.752	1	2	62695.806	62.696	
	325000	43.460	1	2	66861.559	66.862	
PN3	80400	5.547	1	1	1912.862	1.913	<b>1.947</b>
	83500	5.983	1	1	2062.989	2.063	
	79400	5.407	1	1	1864.434	1.864	
PN4	87700	6.573	1	1	2190.841	2.191	<b>2.235</b>
	89700	6.853	1	1	2284.469	2.284	
	88500	6.685	1	1	2228.292	2.228	
PN5	318000	42.345	1	2	76991.021	76.991	<b>77.474</b>
	321000	42.823	1	2	77859.814	77.860	
	320000	42.664	1	2	77570.217	77.570	
PN6	103000	8.721	1	1	2295.074	2.295	<b>2.220</b>
	97300	7.921	1	1	2084.411	2.084	
	101000	8.440	1	1	2281.188	2.281	

\*PN1~6 : Batch별 솔잎 착즙 분말

### 3. Shikimic acid에 대한 Method validation 실시

- 솔잎착즙분말 중 Shikimic acid 함량을 확인하기 위하여 분석법의 유효성을 검증하였다. 설정된 방법으로 분석법의 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확성(Accuracy), 정밀성(Precision), 범위(Range) 등의 항목을 검토하였다.

Table 10. 솔잎 착즙분말 중 Shikimic acid 분석법의 유효성 검증(요약)

항 목	평가 방법	설 정 값
특이성 (Specificity)	HPLC 분석 시 검출시간(Retention time), spectrum, peak purity 검토  HPLC/MS/MS를 분석을 통한 Shikimic acid의 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 검출시간 : 약 8 분</li> <li>○ spectrum : <math>\lambda_{max}</math> 약 210 nm 표준용액과 시험용액 일치</li> <li>○ peak purity : 시험용액 중 Shikimic acid peak가 5 points 일치, 단일물질로 확인됨</li> <li>○ LC MS/MS: TIC에서 동일한 시간대 peak 확인 precursor ion (273 [M-H]<sup>+</sup> m/z) 및 product ion (153 [M-H]<sup>+</sup> m/z) 일치</li> </ul>
직선성 (Linearity)	표준물질에 대한 4개 농도에서 직선성 확인  시료에 대한 5개 농도에서 직선성 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 목적농도의 25~400%에서 확인 18.75~352 mg/L</li> <li>○ R<sup>2</sup> : 0.999</li> <li>○ 목적농도의 25~200%에서 확인</li> <li>○ R<sup>2</sup> : 0.999</li> </ul>
정밀성 (Precision)	3일간 2명의 시험자가 2종의 기기로 반복재현성, 일간, 기기간, 시험자간 정밀성 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 실험실내 정밀성 함량 - 71.8784~73.1678 mg/g RSD(%) - 3.72%</li> <li>○ 반복정밀성 함량 - 70.5452~74.1077 mg/g RSD(%) - 0.53~1.18%</li> </ul>
정확성 (Accuracy)	시료 중 3개 농도로 표준 물질 첨가하여 회수율 검토	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 검출된 표준물질농도 - 64.94~82.41 ug/ml 회수율 - 98.28~102.19%</li> </ul>
범위 (Range)	직선성, 정확도, 정밀도 고려 후 설정	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 솔잎 착즙 분말 58.14~87.20 mg/g</li> </ul>

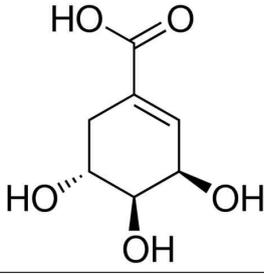
가. 분석방법 : 고속액체크로마토그래피법 (HPLC)

(1) 장비

<b>분석장비 1</b>	Agilent 1100 series, Agilent, USA
	Quat Pump G1311A, Autosampler G1329 Column Oven G1316A, Degasser G1322A
<b>분석장비 2</b>	Agilent 1200 series, Agilent, USA
	Quat Pump G1311A, Autosampler G1329 Column Oven G1316A, Degasser G1322A

(2) 시약

- Shikimic acid: Sigma, 69686, 100.3%

성분명	
CSA Number	138-59-0
Chemical name	(3R,4S,5R)-(-)-3,4,5-Trihydroxy-1-cyclohexenecarboxylic acid
Molecular formula	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>
Molecular weight	174.15

- Trifluoroacetic acid (TFA): Samchun, 100 mL

(3) 표준용액의 조제 : 표준물질 Shikimic acid 40 mg을 정밀히 달아 0.1% TFA in D.W 100 mL (400 ug/mL)에 녹인 후 1 mL 씩 분주하여 냉동보관 된 것을 사용함. 이를 0.1% TFA in D.W로 희석하여 working solution으로 사용함

(4) 시험용액의 조제 : 솔잎 착즙 분말 0.1 g을 정밀히 취하여 0.1% TFA in D.W를 첨가하여 초음파추출 10 min 실시 후 여액을 0.45µm Cellulose acetate syringe filter로 여과한 용액을 사용함

(5) 분석조건

- Instrument: HPLC system
- Detector: UV detector DAD (210 nm)
- Column: YMC Hydrosphere C18 (250\*4.6 mm, 5µm)
- Column Oven: Not control
- Injection vol.: 5 µL
- Flow rate: 0.5 mL/min
- Mobile phase: 0.1% TFA in D.W
- Run time: 15 min

(6) 계산

$$\text{Shikimic acid (mg/g)} = \frac{\text{시험용액 농도 (ug/mL)} \times \frac{\text{Volume (mL)}}{\text{시료 (g)}} \times \frac{1}{1000}}$$

나. 시험법 검증 (Method Validation) 결과

(1) 특이성(Specificity)

(가) 솔잎 착즙분말 중 Shikimic acid의 retention time과 peak 분리도 확인

- Shikimic acid 표준물질과 솔잎 착즙 분말을 동일한 분석법으로 분석하여 검출된 peak를 확인함. 표준용액과 시험용액에서 약 8분대에 peak가 검출되어 동일한 물질임을 확인함. 시험용액에서 주변 peak와의 분리가 완전히 이루어짐을 확인함

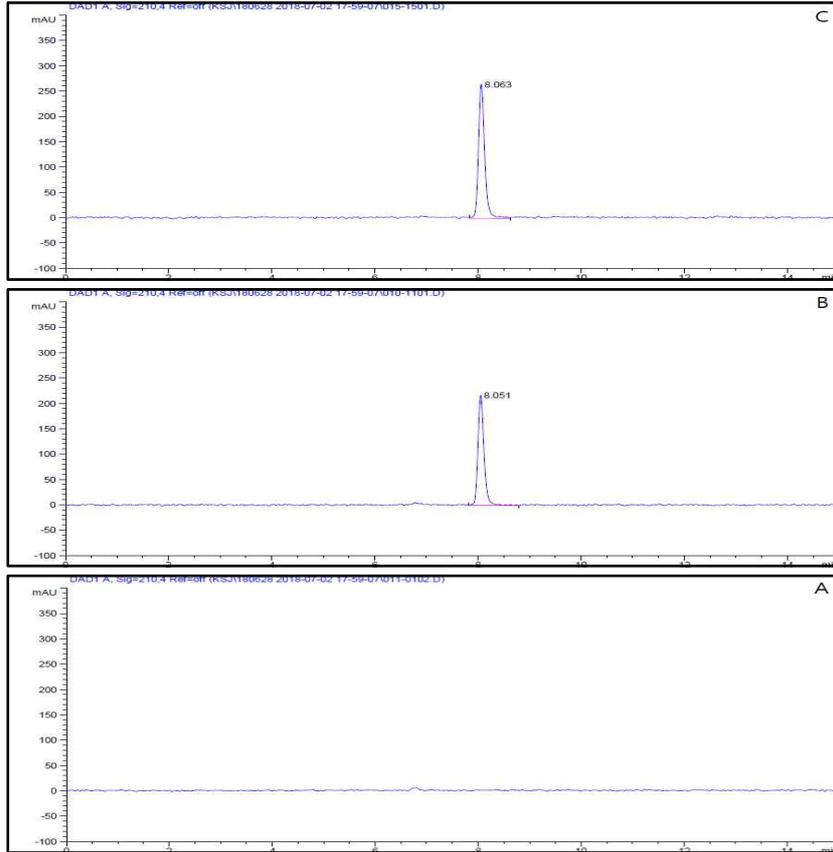
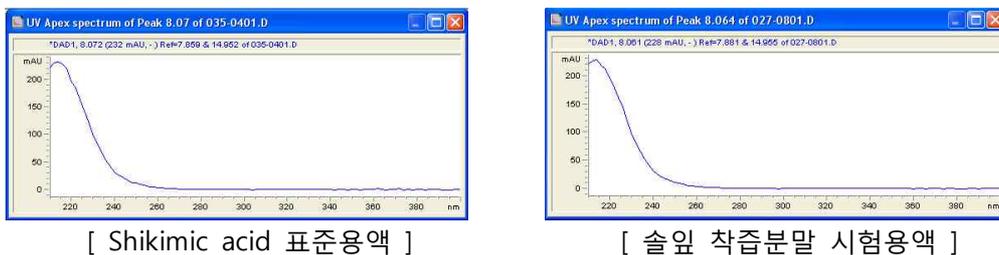


그림 9. 표준용액과 시험용액 중의 Shikimic acid의 Chromatogram  
(A. Blank, B. Shikimic acid 표준용액, C. 시험용액)

(나) 솔잎 착즙분말 중 Shikimic acid의 spectrum과 peak purity 확인

- 시험용액 중 검출된 Chromatogram이 표준용액인 Shikimic acid과 동일한지 확인하기 위하여 표준용액과 시험용액의 spectrum을 확인함.
- 약 8 분대 검출된 peak의 spectrum을 확인한 결과 210nm에서 최대 흡광도를 보였으며, 표준용액과 시험용액에서 동일한 패턴의 spectrum을 나타냄.
- 시험용액의 Shikimic acid peak의 purity를 확인하기 위하여 peak의 5 point spectrum이 모두 일치하여 Shikimic acid 단일물질임을 확인함



[ Shikimic acid 표준용액 ]

[ 솔잎 착즙분말 시험용액 ]

그림 10. Shikimic acid 표준용액과 솔잎 착즙분말 시험용액 UV spectrum

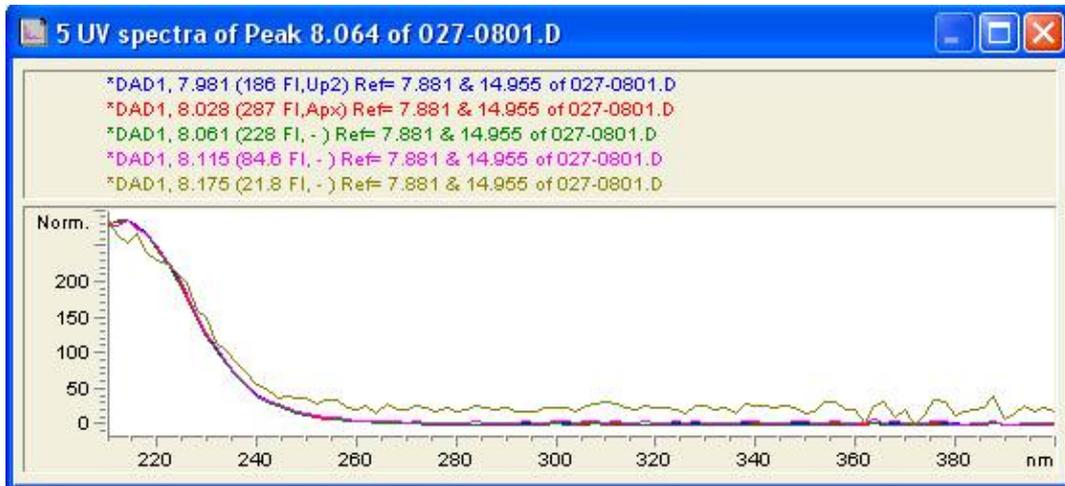


그림 11. peak purity test; 시험용액 중 Shikimic acid peak 각 5점 spectrum 분석

(다) 술잎 착즙분말 중 HPLC/MS/MS를 이용한 Shikimic acid 확인

- ① 술잎 착즙분말 중 Shikimic acid을 확인하기 위하여 LC/MS/MS에 적절한 분석조건을 설정하고, 표준용액과 시험용액 중의 Shikimic acid를 확인함
- ② 실험방법
  - ㉠ 시약 및 시액
    - Shikimic acid 표준품: Sigma, 69686
    - Trifluoroacetic acid (TFA): Samchun, 100 mL
  - ㉡ 표준용액의 제조
    - 표준물질 Shikimic acid 40 mg을 정밀히 달아 0.1% TFA in D.W 100 mL (400 ug/mL)에 녹인 후 1 mL 씩 분주하여 냉동보관 된 것을 사용함
    - 0.1% TFA in D.W로 희석하여 working solution으로 사용함
  - ㉢ 시험용액의 제조
    - 술잎 착즙 분말 0.1 g을 정밀히 취하여 0.1% TFA in D.W를 첨가하여 초음파추출 10 min 실시 후 여액을 0.45um Cellulose acetate syringe filter로 여과한 용액을 사용함
  - ㉣ 분석방법
    - Multiple reaction monitoring(MRM)에서 분석대상물질의 m/z [M-H]<sup>-</sup>에 해당하는 peak를 확인한 후, 분석을 최적화(quantitative optimization) 과정을 수행하여 모분자 (precursor ion/parent ion) 및 딸분자(product ion/daughter ion)를 확인함
  - ㉤ LC/MS/MS 조건
    - Instrument: Agilent 6420
    - Detector : DAD 210 nm
    - Column: YMC Hydrosphere C18 (250\*4.6 mm, 5um)
    - Column Oven: Not control
    - Injection vol.: 1 μL
    - Flow rate: 0.15 mL/min

- Mobile phase: A, H<sub>2</sub>O in 0.1% TFA; B, MeCN in 0.1% TFA

min	A (%)	B (%)
0	80	20
20	20	80

㉞ Mass 조건

- LCMS: LCMS QQQ (Quadrupole)
- Ionization type: ESI negative
- Multiple reaction monitoring : 173
- N<sub>2</sub> gas flow: 10 L/min
- CDL temp.: 350℃

㉟ 실험결과

- ㉠ 솔잎 착즙분말 중 Shikimic acid을 확인하기 위하여 LC/MS/MS로 분석함
- ㉡ 분석결과 : 표준용액과 시험용액에서 동일한 시간대의 Total ion Chromatogram (TIC)을 확인할 수 있었고, 질량 스펙트럼을 확인해 본 결과 precursor ion은 173.0 [M-H]<sup>-</sup> m/z이고, product ion은 93.0, 43.0 m/z로 확인함

Table 11. Shikimic acid 분석을 위한 Retention time, Precursor ion 및 Product ion

Compound	RT (min)	MW	Precursor ion (MS, m/z)	Product ion (MS <sup>2</sup> m/z)
Shikimic acid	1.67~1.73	174.15	173.0 [M+H] <sup>-</sup>	93.0, 43.0

(다) 위의 제시된 분석조건으로 HPLC/MS/MS를 이용하여 분석한 결과 표준용액과 시험용액에서 TIC에서 동일한 시간대에 peak를 확인하였고, precursor ion (173 [M+H]<sup>-</sup> m/z) 및 product ion (93 m/z, 43 m/z)이 유사한 값을 가지므로 표준용액과 솔잎 착즙분말 중의 Shikimic acid이 동일 성분임을 확인 할 수 있었으며, 솔잎 착즙분말 중 Shikimic acid이 함유되어 있음을 확인함

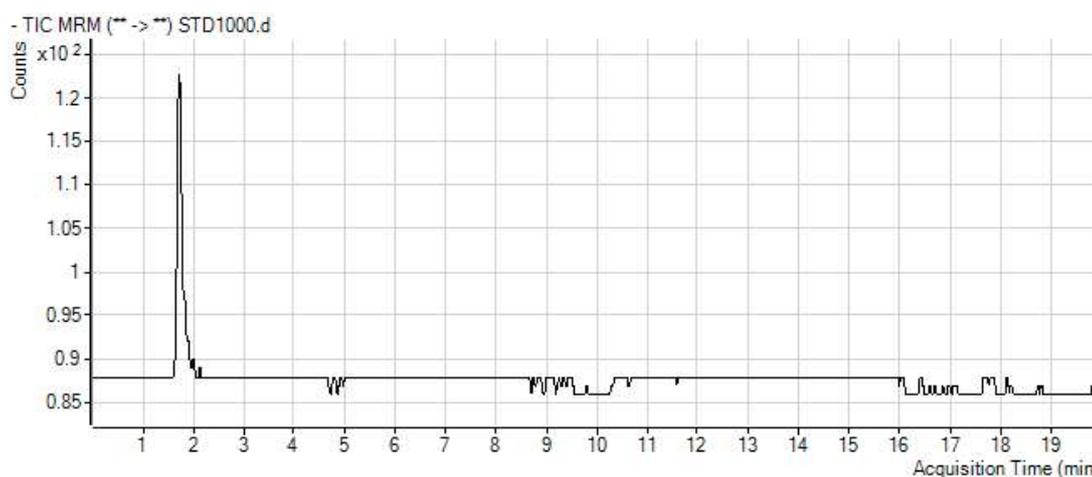


그림 12. Shikimic acid 표준용액 chromatogram

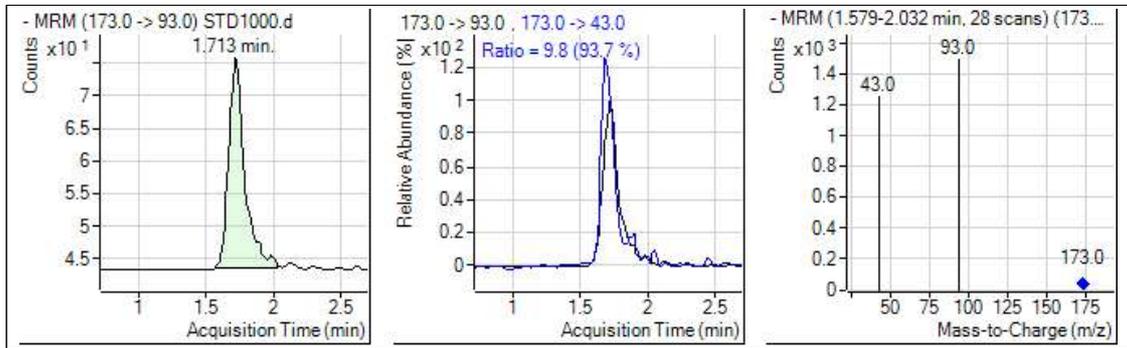


그림 13. Shikimic acid 표준용액 질량 스펙트럼

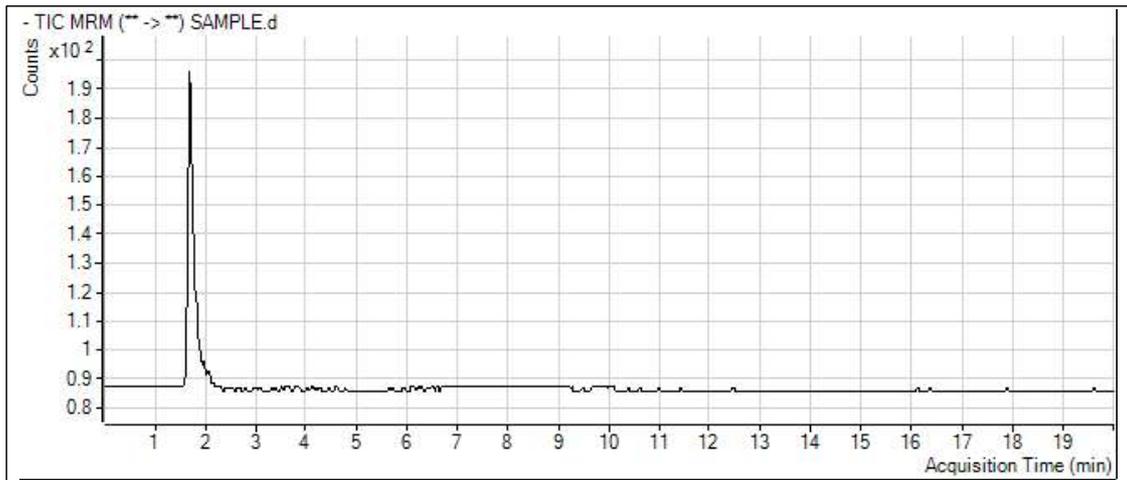


그림 14. 솔잎 착즙분말 chromatogram 및 TIC

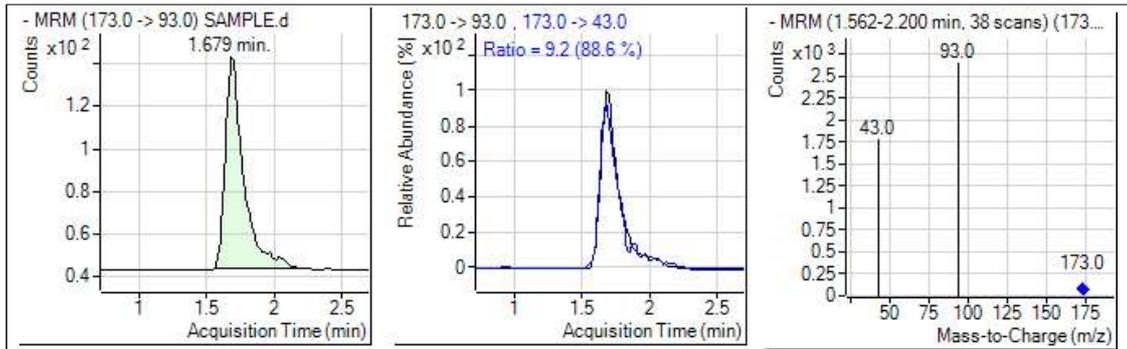


그림 15. 솔잎 착즙분말 질량 스펙트럼

## (2) 직선성 (Linearity)

### (가) 표준물질에 대한 직선성

- ① 표준물질을 농도별로 희석하여 분석한 결과로 직선성을 평가함
- ② Shikimic acid의 검출농도 약 80 ug/mL를 목적농도 100%로 설정하여 25~400% 범위에서 3회 반복 평가함
- ③ 분석결과 농도별로 직선성을 확인되었으며, 기울기 값은 27.3205~27.8309,  $R^2$ 는 0.9993~1.0000 으로 나타남

Table 12. Shikimic acid 표준용액을 이용한 검량선 작성 (1회 실험)

농도 (%)	검출 농도 (ug/mL)	면적 (area)	검량선
25	22	649.31519	
50	44	1265.53259	
100	88	2527.65723	
200	176	4951.04932	
400	352	9672.48926	
기울기	27.3205		
y 절편	86.1353		
R2	0.9999		

Table 13. Shikimic acid 표준용액을 이용한 검량선 작성 (2회 실험)

농도 (%)	검출 농도 (ug/mL)	면적 (area)	검량선
25	18.75	546.38971	
50	37.50	1134.72009	
100	75.00	2218.29028	
200	150.00	4390.39941	
400	300.00	8350.22168	
기울기	27.6045		
y 절편	109.3542		
R2	0.9993		

Table 14. Shikimic acid 표준용액을 이용한 검량선 작성 (3회 실험)

농도 (%)	검출 농도 (ug/mL)	면적 (area)	검량선
25	22	619.38135	
50	44	1234.39941	
100	88	2457.25488	
200	176	4915.43164	
400	352	9804.52832	
기울기	27.8309		
y 절편	9.4936		
R2	1.0000		

(라) 시료에 대한 직선성

- ① 솔잎 착즙분말을 증량별로 측정하여 전 처리한 결과로 직선성을 평가함
- ② 솔잎 착즙분말 100 mg을 취해 이동상(0.1% TFA in D.W) 100 mL를 넣고 초음파 추출 10 min 실시 후 여액을 0.45µm Cellulose acetate syringe filter로 여과한 용액을 시험용액의 검출 농도 80 ug/mL를 목적농도 100%로 설정하여 25~200% 범위에서 평가한 결과 농도별로 직선성을 확인함
- ③ 기울기 값은 19,342.3928~20,390.5218 R<sup>2</sup>는 0.9994~0.9998 으로 나타남

Table 15. 솔잎 착즙분말을 이용한 검량선 작성 (1회 실험)

농도 (%)	솔잎 착즙분말 채취량 (mg)	면적 (area)	검량선
25	22.5	469.19510	
50	53.6	1121.13245	
75	77.1	1597.37732	
100	108.7	2193.67041	
200	208.9	4188.72168	
기울기	19,863.2210		
y 절편	43.6985		
R <sup>2</sup>	0.9998		

Table 16. 솔잎 착즙분말을 이용한 검량선 작성 (2회 실험)

농도 (%)	솔잎 착즙분말 채취량 (mg)	면적 (area)	검량선
25	24.7	518.75702	
50	58.5	1232.07642	
75	74.7	1539.66992	
100	105.1	2216.77026	
200	0.1999	4092.22876	
기울기	20,390.5218		
y 절편	32.1460		
R <sup>2</sup>	0.9997		

Table 17. 솔잎 착즙분말을 이용한 검량선 작성 (3회 실험)

농도 (%)	솔잎 착즙분말 채취량 (mg)	면적 (area)	검량선
25	31.4	651.98358	
50	52.3	1128.75024	
75	81.4	1701.04419	
100	100.9	2073.03076	
200	211.7	4166.75293	
기울기	19,342.3928		
y 절편	85.8952		
R <sup>2</sup>	0.9994		

(3) 정밀성(Precision)

(가) 실험실내 정밀성 (Intermediate precision)

- ① 솔잎 착즙분말 중 Shikimic acid 함량 분석 정밀성 시험을 위해 분석자와 분석 일자 및 분석장비를 달리하여 분석을 진행함
- ② 결과는 시료를 6회 반복 전 처리한 후 실험하여 측정치를 비교하였고, 3일간 두명의 시험자가 분석함
- ③ 분석결과 Shikimic acid 함량은 평균 72.6693 mg/g, 표준편차(SD) 0.6926 mg/g, 상대표준편차(RSD)는 0.95%로 나타남

Table 18. 분석일자, 분석자간의 Shikimic acid 함량

	일자	분석자	분석 장비	Shikimic acid 함량(mg/g)	평균 (mg/g)	SD (mg/g)	RSD(%)
1	18.07.04	A	Agilent 1100	73.1678	72.6693	0.6926	0.95
2	18.07.05	B	Agilent 1100	71.8784			
3	18.07.06	A	Agilent 1200	72.9617			

(나) 반복 정밀성 (Repeatability, Intra-assay precision)

- ① 솔잎 착즙분말 중 Shikimic acid 함량 분석의 반복 정밀성을 확인하기 위해 한번 진행시 각각 6번의 전처리하여 분석을 진행함
- ② 일자를 달리하여 측정한 결과 70.5452~74.1077 mg/g범위로 검출되었으며, 각 일자에서의 함량은 평균 71.8784~73.1678 mg/g, 표준편차(SD) 0.3892~0.8607mg/g, 상대표준편차(RSD) 0.53~1.18 %로 분석됨

Table 19. 분석일 7월 4일, 분석자 A, Agilent 1100 series

	시료채취량 (g)	Area	시험용액 농도 (ug/mL)	Shikimic acid 함량 (mg/g)	평균 (mg/g)	SD (mg/g)	RSD(%)
1	0.1102	2292.59424	80.7621	73.2868	73.1678	0.8607	1.18
2	0.1141	2353.89966	83.0060	72.7485			
3	0.1121	2355.77539	83.0747	74.1077			
4	0.1103	2294.95190	80.8484	73.2986			
5	0.1135	2376.39868	83.8296	73.8587			
6	0.1151	2340.99902	82.5339	71.7063			

Table 20. 분석일 7월 5일, 분석자 B, Agilent 1100 series

	시료채취량 (g)	Area	시험용액 농도 (ug/mL)	Shikimic acid 함량 (mg/g)	평균 (mg/g)	SD (mg/g)	RSD(%)
1	0.1051	2221.31372	76.5078	72.7952	71.8784	0.8477	1.18
2	0.1050	2207.24756	75.9982	72.3792			
3	0.1052	2179.13525	74.9798	71.2736			
4	0.1042	2174.73047	74.8203	71.8045			
5	0.1048	2150.19360	73.9314	70.5452			
6	0.1051	2211.95093	76.1686	72.4725			

Table 21. 분석일 7월 6일, 분석자 A, Agilent 1200 series

	시료채취량 (g)	Area	시험용액 농도 (ug/mL)	Shikimic acid 함량 (mg/g)	평균 (mg/g)	SD (mg/g)	RSD(%)
1	0.1066	2183.03711	78.0982	73.2629	72.9617	0.3892	0.53
2	0.1025	2071.89185	74.1046	72.2972			
3	0.1035	2120.65552	75.8568	73.2916			
4	0.1053	2148.53955	76.8587	72.9902			
5	0.1020	2073.95044	74.1786	72.7241			
6	0.1025	2097.77344	75.0346	73.2045			

(4) 정확성(Accuracy), 회수율(Recovery)

- (가) 솔잎 착즙분말 중 Shikimic acid의 정확성을 측정하기 위해 솔잎 착즙분말(72.6693 mg/g, 정밀성 결과)에 이미 농도를 알고 있는 표준용액을 넣어 회수율을 구함으로써 정확성을 확인함
- (나) 검출농도를 고려하여 솔잎 착즙분말 80 mg을 취한 후 표준품으로써 0.5265, 1.0530, 2.1060 mg 되도록 0.351 mg/mL의 표준용액을 넣고 동일한 전처리 방법으로 분석을 진행함
- (다) 농도별로 3회 반복하여 진행한 결과 회수율 98.28~102.19%로 나타남. 전체적으로 95% 이상의 회수율을 보임으로 정확성을 확인함

Table 22. 솔잎 착즙분말 정확성 및 회수율

이름	시료수	검체 무게 (g)	Shikimic acid의 양		시험용액의 분석농도(ug/mL)		회수율 (%)
			sample 유래	표준품 유래	기대치	실험치	
정확성 1	1	0.0903	6.5621	0.5265	70.89	70.57	99.55
	2	0.0818	5.9444	0.5265	64.71	64.27	99.32
	3	0.0821	5.9662	0.5265	64.93	65.94	101.55
정확성 2	1	0.0853	6.1988	1.0530	72.52	72.37	99.79
	2	0.0811	5.8935	1.0530	69.47	70.99	102.19
	3	0.0804	5.8427	1.0530	68.96	69.29	100.48
정확성 3	1	0.0825	5.9953	2.1060	81.01	79.62	98.28
	2	0.0818	5.9444	2.1060	80.50	80.66	100.19
	3	0.0829	6.0243	2.1060	81.30	82.41	101.37

(5) 범위(range)

- (가) 솔잎 착즙분말 중 Shikimic acid 함량을 정량하기 위한 분석법의 정량 범위는 직선성과 정밀도, 정확성을 고려하여, 62.25~93.37 ug/mL의 범위로 설정함
- (나) 이 농도는 솔잎 착즙분말 0.1 g을 이용하여 분석하는 경우이며, 솔잎 착즙분말의 Shikimic acid의 함량이 58.14~87.20 mg/g인 검체에 대해서 정확하고 정밀한 Shikimic acid 정량이 가능함을 확인함

#### 4. 솔잎착즙분말의 제조 공정 표준화

##### 가. 제조공정도

○ 채취한 솔잎 원료로부터 최종 솔잎 착즙액을 제조하는 공정은 아래 그림 16.와 같다.



그림 16. 솔잎 착즙 분말 제조 공정도

##### 나. 원료 채취 시기별 시료 수득

- (1) 2월부터 6월까지 5개월간 월별로 채취한 솔잎 원료를 각각 착즙하여 수득한 착즙액을 각각 1.6kg씩 칭량하여 동결건조(PVTFD 10R, Ilshin lab Co., korea) 후, 분말화한 것을 시료로 사용함
- (2) 월별로 채취한 솔잎 원료의 착즙액을 동결건조하여 분말화한 결과는 아래 Table 23.와 같음
- (3) 월별로 22.19~28.75%의 건조 수율을 보였으며, 3월에 채취한 솔잎의 착즙액의 건조수율이 28.75%로 가장 높았고, 5월에 채취한 솔잎의 착즙액의 건조수율이 22.19%로 가장 낮음. 월의 변화에 따른 유의적인 변화는 나타나지 않음

Table 23. Yield of dry of pine needle according to collection time.

Sample	Collection Times	Sample weight (g)	Dry weight (g)	Yield of dry (%)
Pine needle	February	1.600	394.0	24.63
	march	1.600	460.0	28.75
	april	1.600	445.5	27.84
	May	1.600	355.0	22.19
	June	1.600	418.5	26.16

### 제 3 절. 솔잎착즙분말의 체지방 개선 효능 *In vitro* 연구

#### 1. Pancreatic lipase 억제 효능 평가

##### 가. 개요

- (1) 췌장 리파아제(pancreatic lipase)는 췌장에서 만들어져 십이지장으로 분비되는 중성지방 분해효소로, 지방의 소화를 진행하고 장내 상피세포가 분해산물을 흡수하도록 도움
- (2) 지방은 췌장 리파아제에 의해 분해되어 흡수되기 때문에 이 효소의 활성이 억제되면 중성지방의 분해와 함께 소장세포 및 소화관으로의 지방 흡수가 저해되므로 중성 지방은 흡수되지 않고 대변을 배출됨

##### 나. 실험방법

- (1) Sample 준비 : 준비된 sample을 MeOH 또는 DMSO에 녹인 후 MeOH 또는 distilled water를 이용하여 실험에 적합한 농도로 희석하여 사용함
- (2) Buffer 조성

Enzyme buffer	10 mM MOPS, 1 mM EDTA, pH 6.8
Tris buffer	100 mM Tris-HCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 7.0
Substrate buffer	10 mM p-NPB in EtOH
Positive control	1 mg/ml orlistat in MeOH

(3) Pancreatic lipase inhibition 측정

- (가) Enzyme buffer 5  $\mu$ l에 tris-HCl buffer 170  $\mu$ l를 섞은 후, pancreatic lipase 300  $\mu$ g을 녹이고, 96-well plate에 분주함
- (나) Sample을 well에 20  $\mu$ l씩 처리 후 37°C에서 15분간 incubation 함
- (다) Substrate buffer를 5  $\mu$ l넣어준 후 37°C에서 20분간 incubation 함
- (라) UV-spectrophotometer를 이용하여 absorbance 400 nm에서 측정함

다. 실험결과

(1) Ethanol 추출물의 lipase 억제 효과

- (가) EtOH 추출물의 경우 100 ~ 300  $\mu$ g/ml 농도에서 pancreatic lipase 억제가 나타남
- ① EtOH 추출물의 경우 MeOH에 녹였을 경우, 일부 물질이 MeOH에 녹지 않아, pellet이 생겼으며, 이를 제외하고 상층액을 이용하여 실험을 진행함
- ② 400  $\mu$ g/ml를 처리 하였을 경우, MeOH에 녹은 sample의 특성상 석출이 일어나 측정이 어려움
- 200, 300  $\mu$ g/ml 농도에서의 억제 효과는 positive control인 P-1(orlistat 1  $\mu$ g/ml), P-2(orlistat 10  $\mu$ g/ml)과 효과가 유사함을 나타내며, 농도 의존적으로 억제 효과가 나타남
- ③ EtOH 추출물에 pancreatic lipase 억제 성분이 다량 포함되어 있음을 예상 할 수 있음

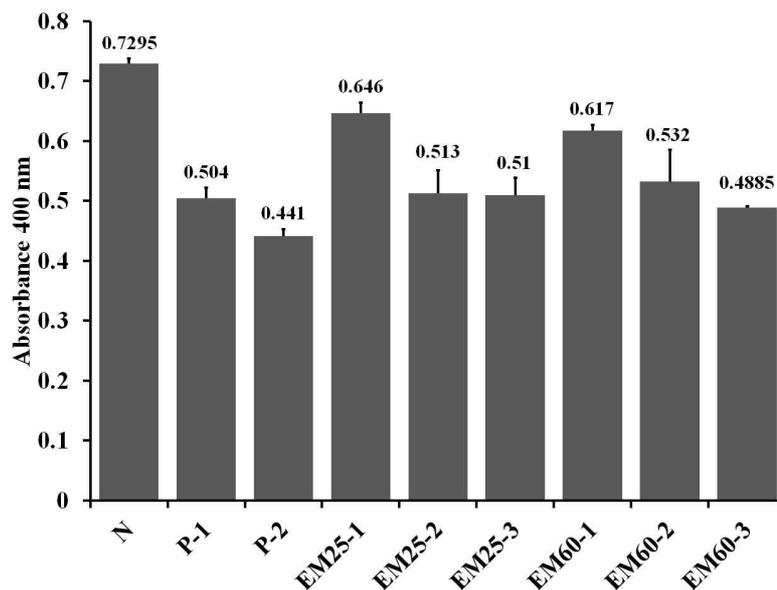


그림 17. EtOH 추출 후 MeOH로 희석한 sample의 lipase 억제 측정. N; negative control(MeOH), P-1; positive control (orlistat 1  $\mu$ g/ml), P-2; positive control (orlistat 10  $\mu$ g/ml), EM25-1,2,3; EtOH을 이용하여 25°C 추출 후 MeOH에 희석한 100, 200, 300  $\mu$ g/ml sample, EM60-1,2,3; EtOH을 이용하여 60°C 추출 후 MeOH에 희석한 100, 200, 300  $\mu$ g/ml sample

(나) EtOH 추출 후 DMSO에 녹이고 MeOH로 희석을 하였을 경우, DMSO에 sample이 모두 녹았으며, MeOH에 희석을 진행하여도 pellet이 생기지 않아 100 ~ 400  $\mu\text{g/ml}$  까지 효과를 측정함 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 경우 석출이 일어나 효과를 측정이 불가능하였으며, 농도 의존적으로 효과가 증가함을 확인함

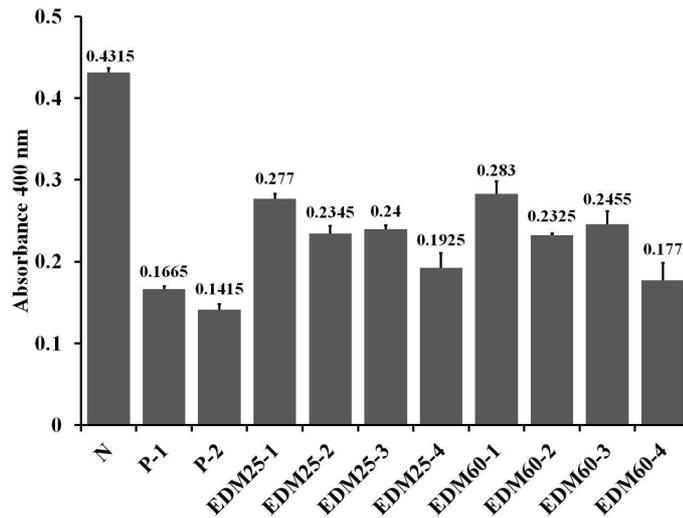


그림 18. EtOH 추출 후 DMSO로 녹이고 MeOH로 희석한 sample의 lipase inhibition 효과 측정. N; negative control(MeOH), P-1; positive control (orlistat 1  $\mu\text{g/ml}$ ), P-2; positive control (orlistat 10  $\mu\text{g/ml}$ ), EDM25-1, 2, 3, 4; EtOH을 이용하여 25 $^{\circ}\text{C}$  추출 후 DMSO에 녹이고, MeOH에 희석한 100, 200, 300, 400  $\mu\text{g/ml}$  sample, EDM60-1, 2, 3, 4; EtOH을 이용하여 60 $^{\circ}\text{C}$  추출 후 DMSO로 녹이고, MeOH에 희석한 100, 200, 300, 400  $\mu\text{g/ml}$  sample

(2) 열수 추출물의 lipase 억제 효과

(가) 열수 추출물의 경우 MeOH로 녹였을 시, 다량의 pellet이 발생되었으며, 이를 제외한 상층액을 이용하여 실험을 진행함. 100 ~ 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 효과를 측정 하였을 때, pancreatic lipase 억제 효과가 나타나지 않음

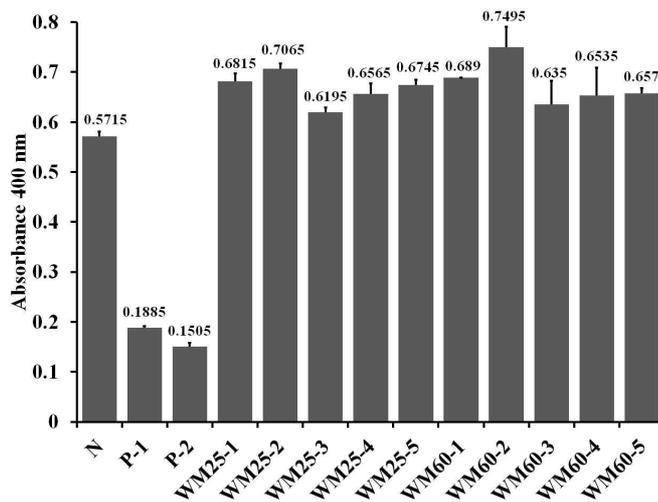


그림 19. EtOH 추출 후 DMSO로 녹이고 MeOH로 희석한 sample의 lipase inhibition 효과 측정. N; negative control(MeOH), P-1; positive control (orlistat 1  $\mu\text{g/ml}$ ), P-2; positive control (orlistat 10  $\mu\text{g/ml}$ ), EDM25-1, 2, 3, 4; EtOH을 이용하여 25 $^{\circ}\text{C}$  추출 후 DMSO에 녹이고, MeOH에 희석한 100, 200, 300, 400  $\mu\text{g/ml}$  sample, EDM60-1, 2, 3, 4; EtOH을 이용하여 60 $^{\circ}\text{C}$  추출 후 DMSO로 녹이고, MeOH에 희석한 100, 200, 300, 400  $\mu\text{g/ml}$  sample

(나) 열수 추출물의 경우 DMSO로 녹였을 시, 모두 완전히 녹음을 확인하였으며, 이를 pure water 를 이용하여 희석 후 실험을 진행함

① 100 ~ 500  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 효과를 측정 하였을 때, 약간의 pancreatic lipase 억제 효과가 나타나지 않음

② 그림 3과 비교 하였을 때, MeOH에 녹인 sample에 생긴 pellet에 lipase 억제 물질이 소량 포함되어 있음을 예상 할 수 있음

(3) MeOH 추출물의 lipase 억제 효과

(가) MeOH 추출물의 경우 200 ~ 500  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 pancreatic lipase 억제 효과가 나타남. 300  $\mu\text{g/ml}$  이상을 처리 하였을 경우, MeOH에 녹은 sample의 특성상 약간의 석출이 일어남을 육안으로 확인함

(나) MeOH 추출물의 경우 200 ~ 500  $\mu\text{g/ml}$ 에서 농도 의존적으로 억제 효과가 나타남

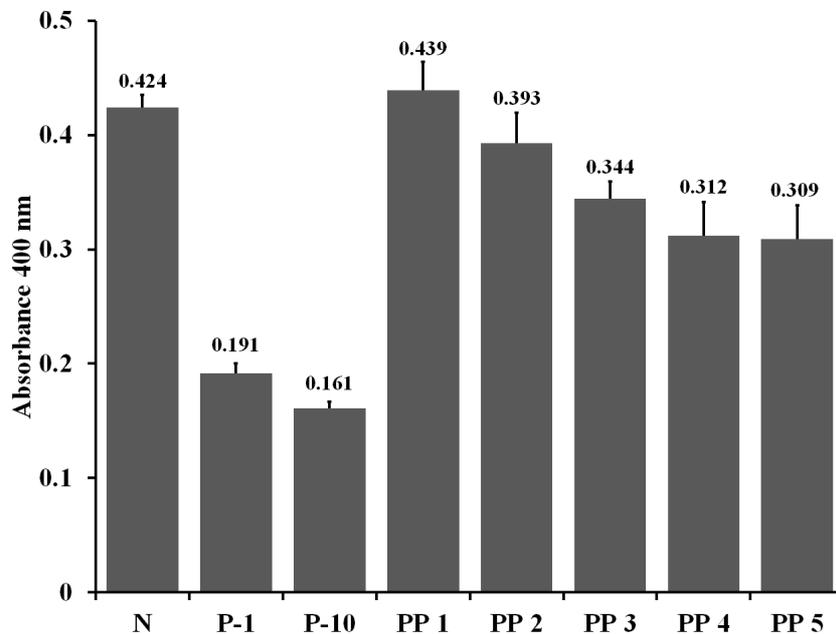


그림 20. MeOH 추출한 sample의 lipase inhibition 효과 측정.

## 2. 3T3-L1 지방전구세포를 이용한 지방분화 억제 실험

가. 개요

- (1) 에너지 이용과 식이 섭취의 불균형으로 인해 지방전구세포의 지방세포로의 분화에 관여하는 유전자의 발현이 증가함
- (2) 분화된 지방세포에 축적된 지방은 혈중 또는 간에서의 지질 함량을 증가시킴
- (3) Oil red O 염색법은 지방세포에 축적된 지방구를 염색하는 실험법으로 염료가 용매보다 지질에 상대적으로 잘 용해되어 지질에 착색되는 용해도의 차이를 이용한 방법이며 지방구가 붉은색으로 염색됨

나. 실험방법

- (1) 3T3-L1 지방전구세포는 10% BCS(Bovine Calf Serum), 100unit/mL의 페니실린(penicilin)

및 100ng/mL의 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, WELGENE, Korea) 배지에서 37°C 및 5% CO2 조건으로 배양함

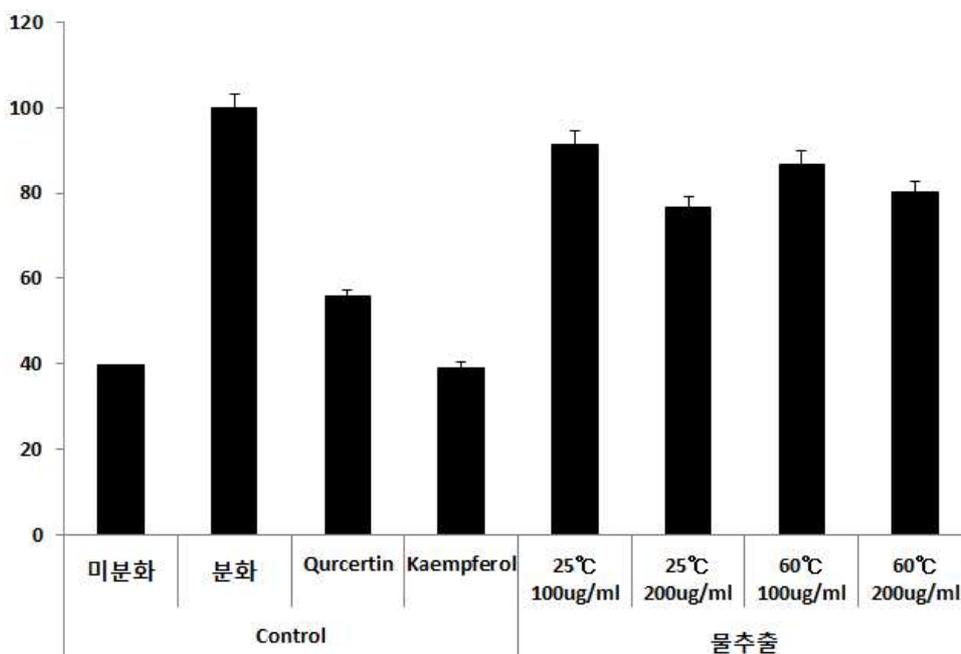
- (2) 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포 분화를 유도하기 위해, 세포가 60mm 플레이트에 균일하게 자랐을 때 분화 유도물질인 MDI(10 $\mu$ g/mL insulin, 1 $\mu$ M dexamethasone 및 0.5mM IBMX(Sigma, USA)), 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 100unit/mL의 페니실린(penicilin) 및 100ng/mL의 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함한 DMEM로 배지를 교체하였으며, 이때 슬릿 추출물도 함께 처리함
- (3) 2일 간격으로 10 $\mu$ g/mL의 인슐린(insulin), 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 100unit/mL의 페니실린(penicilin) 및 100ng/mL의 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함한 DMEM 배지로 교체해주었으며, 6일간 분화를 유도함
- (4) 지방세포분화능은 Oil-red O 염색법을 이용하여 측정함
  - (가) 지방세포로 분화된 3T3-L1 지방전구세포를 PBS(Phosphate-buffered saline)를 이용해 2~3회 세척한 후, 10% 포르말데히드(formaldehyde)를 이용하여 30분간 고정함
  - (나) PBS를 이용해 2~3회 완전히 세척한 후 60% 이소프로판올(isopropanol)에 5mg/mL로 녹인 Oil-red O 염색약을 이용하여 1시간 동안 염색함
  - (다) 염색 후 PBS를 이용하여 2~3회 남은 염색약을 완전히 세척한 후 현미경을 통하여 염색 정도를 확인하였으며, 이후 100% 이소프로판올을 이용하여 염색된 Oil-red O를 완전히 녹여 UV 분광광도계(spectrophotometer, BioTec, Eon)를 이용하여 지방세포분화능을 측정함

#### 다. 실험결과

- (1) Quercertin과 Kaempferol은 이미 지방분해억제능이 확인 된 Chemical로 비교를 위해 사용됨
  - 각각의 Chemical은 100uM의 농도로 처리 하였고, 슬릿추출물은 100ug/ml과 200ug/ml로 처리 함

#### (2) 실험결과

- (가) 슬릿착즙분말의 물 추출 샘플에서 추출온도에 상관없이 농도에 따라 지방분해 효과가 나타남
- (나) 에탄올 추출 샘플에서는 지방분해 효과가 나타나지 않음을 확인함



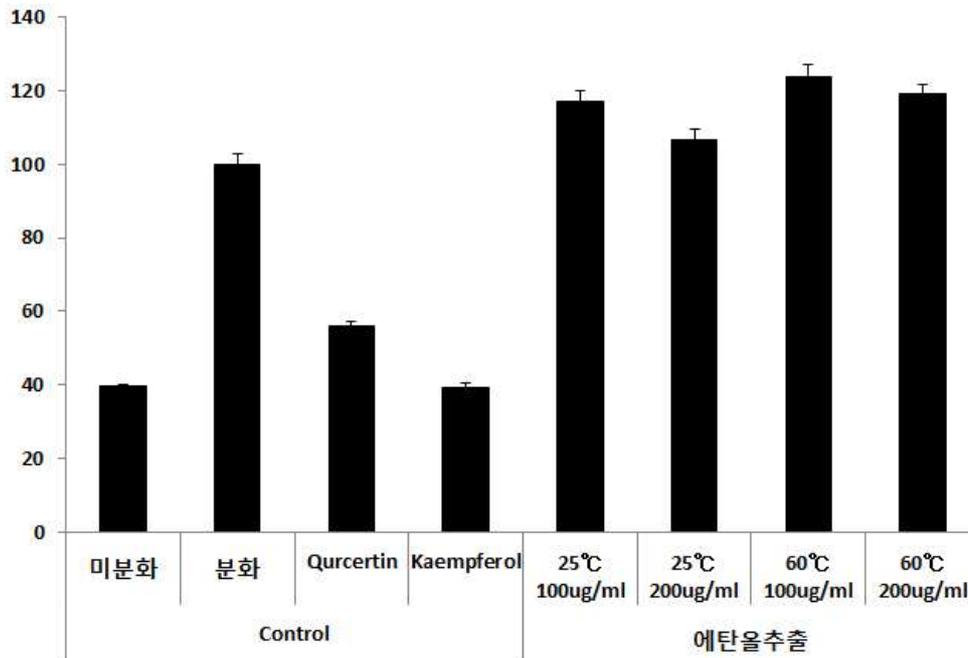


그림 21. 솔잎착즙분말의 3T3-L1 지방전구세포에서 지방분해 억제 실험

### 3. 3T3-L1 지방전구세포를 이용한 지방 분해 실험

#### 가. 개요

- 지방분해가 일어나면 중성지방 (triglyceride)이 분해되면서 glycerol이 방출되므로 세포배양 배지 중의 glycerol 농도가 높아짐

#### 나. 실험방법

- (1) 3T3-L1 지방전구세포는 10% BCS(Bovine Calf Serum), 100unit/mL의 페니실린(penicilin) 및 100ng/mL의 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, WELGENE, Korea) 배지에서 37°C 및 5% CO2 조건으로 배양함
  - (가) 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포 분화를 유도하기 위해, 세포가 60mm 플레이트에 균일하게 자랐을 때 분화 유도물질인 MDI(10 $\mu$ g/mL insulin, 1 $\mu$ M dexamethasone 및 0.5mM IBMX(Sigma, USA)), 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 100unit/mL의 페니실린(penicilin) 및 100ng/mL의 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함한 DMEM로 배지를 교체함
  - (나) 2일 간격으로 10 $\mu$ g/mL의 인슐린(insulin), 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 100unit/mL의 페니실린(penicilin) 및 100ng/mL의 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함한 DMEM 배지로 교체해주었으며, 6일간 분화를 유도함
- (2) Glycerol 함량 측정
  - (가) Free glycerol reagent(Sigma, USA)를 이용하여 측정함
  - (나) 지방분화가 유도된 세포에 솔잎 추출물을 처리하여 지방 분해능을 확인함
  - (다) 배양액 내 glycerol 함량은 시료 처리 후 24h, 48h 두 번에 걸쳐 UV 분광광도계 (spectrophotometer, BioTec, Eon)를 이용하여 측정함

#### 다. 실험결과

- (1) Forskolin은 이미 지방분해능이 확인 된 Chemical로 비교를 위해 사용됨
- (2) Forskolin은 50, 100uM의 농도로 처리하였으며, 각각의 추출물은 100, 200ug/ml의 농도로 처리함
- (3) 실험은 샘플 처리 후 24h, 48h 2회 측정 하였으며, 실험결과 솔잎착즙분말의 물 추출 및 에탄올 추출 샘플 모두 지방분해 효과가 나타나지 않음을 확인함

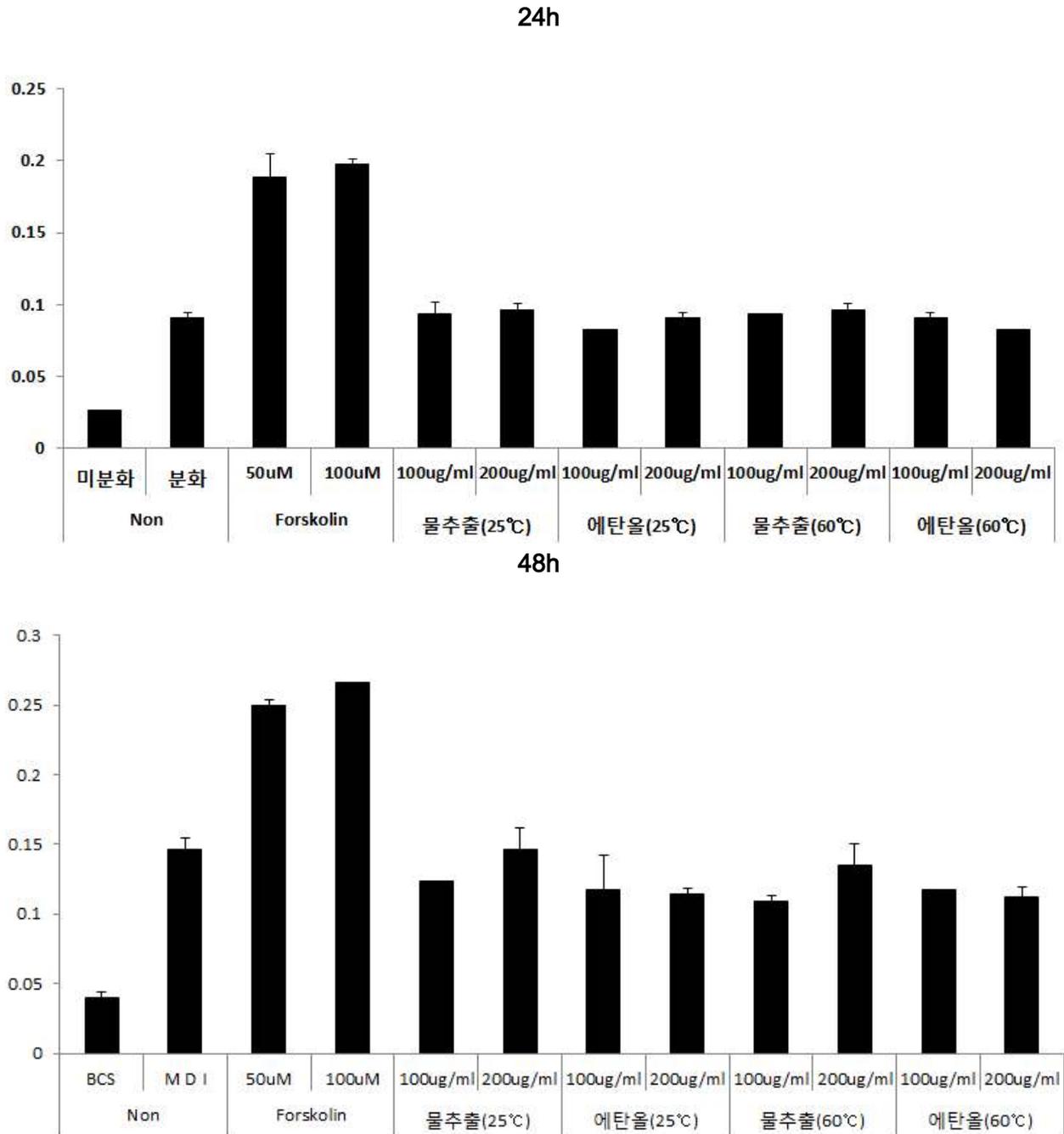


그림 22. 3T3-L1 지방전구세포를 이용한 지방 분해 실험

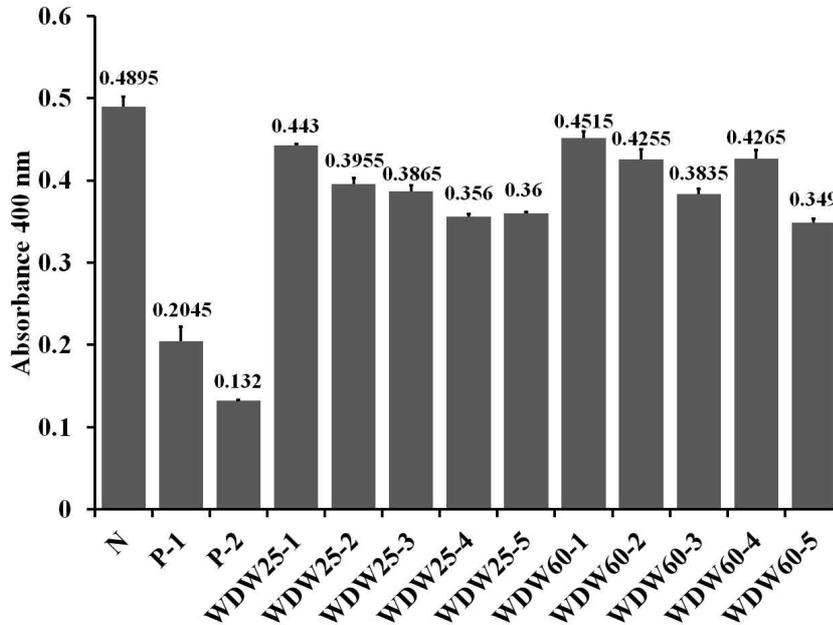


그림 23. EtOH 추출 후 DMSO로 녹이고 MeOH로 희석한 sample의 lipase inhibition 효과 측정. N; negative control(MeOH), P-1; positive control (orlistat 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), P-2; positive control (orlistat 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), EDM25-1, 2, 3, 4; EtOH을 이용하여 25°C 추출 후 DMSO에 녹이고, MeOH에 희석한 100, 200, 300, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sample, EDM60-1, 2, 3, 4; EtOH을 이용하여 60°C 추출 후 DMSO로 녹이고, MeOH에 희석한 100, 200, 300, 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  sample

#### 4. 솔잎착즙분말 추출물이 제브라피쉬에 미치는 영향 분석

##### 가. 개요

- 포유류에서 식욕증진 단백질로 알려진 Melanin-concentrating hormone (MCH)이 어류에서는 색소세포의 형태 변환에 영향을 줌
- (1) 시험 제브라피쉬는 MCH-GFP가 삽입된 제브라피쉬는 수정 후 30시간에 멜라닌소체가 분산되는 야생형 제브라피쉬와는 달리 멜라닌소체가 응집되는 특징이 있음
- (2) MCH-제브라피쉬의 멜라닌소체가 분산되는 정도를 관찰하여 비만억제를 위한 식욕억제효과를 확인함
- (3) 멜라닌소체의 분산 정도는 멜라닌소체의 면적을 측정하여 솔잎착즙분말의 비만억제효과를 분석함

##### 나. 실험과정

- (1) 건강한 어미로부터 산란된 배아는 메틸렌블루 용액으로 잠시 소독해주고 약 22시간에서 28시간 (멜라닌소체가 생성되지 않는 시기) 동안 배양기에서 배양
- (2) 형광현미경을 이용하여 형광이 발현된 개체 선별
- (3) 선별된 수정란은 노출의 효과를 최대화 하기 위하여 현미경하에서 핀셋으로 제브라피쉬의 난막을 제거
- (4) Well 당 3 ~ 5 마리씩 넣오준 후 well의 희석수를 제거하고, 시험용액 첨가
- (5) 시험물질을 10시간 동안 노출 시킨 후, 치사 개체를 확인 후, 치사 개체는 즉각 폐기
- (6) 현미경 관찰 전 Tricaine으로 마취 후 생존한 제브라피쉬 등쪽의 난황에 있는 멜라닌소체의 분산 정도를 현미경으로 확인 및 사진 촬영
- (7) 난황의 좌/우에서 각각 3개의 멜라닌소체를 무작위로 선정하고 이미지 측정 프로그램을 이용하여 멜라닌소체의 면적을 계산하여 분산 정도를 측정함

다. 실험결과

- (1) 솔잎 추출물 2종에 대해 식욕억제효능평가를 수행함. 노출 후 멜라닌소체의 크기 변화를 통해 식욕억제효능을 검증함
- (2) 솔잎 에탄올 추출물에 대한 시험결과, 대조군보다 노출군에서 2배 이상 멜라닌소체의 크기가 증가한 것을 확인하였음. 3.125, 12.5, 50 ppm에서 농도의존적인 결과를 보였음
- (3) 솔잎 열수 추출물에 대한 시험 결과, 일부 노출군에서 대조군에 비해 증가된 멜라닌소체가 관찰되었으며, 12.5ppm 에서 2개체, 50 ppm에서 3개체의 치사가 발생되어 관찰결과의 판독이 어려움

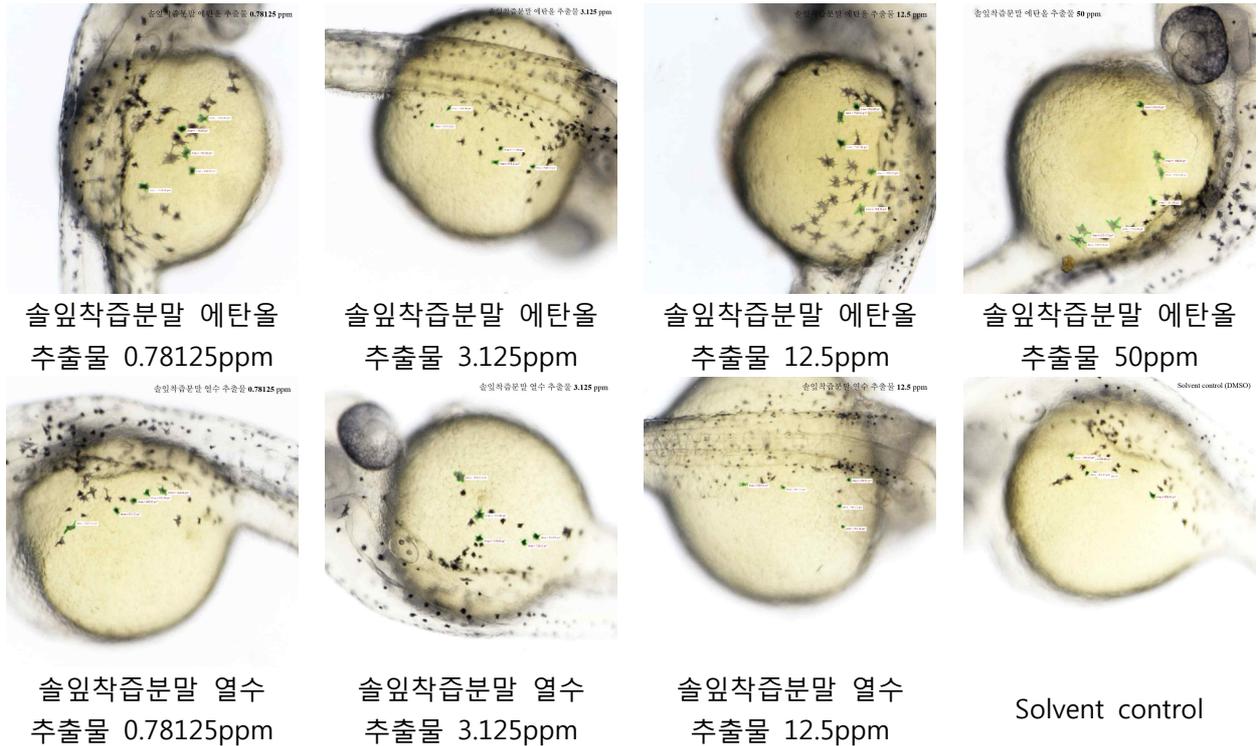


그림 24. 제브라피쉬에서 솔잎착즙분말의 식욕억제효능 평가를 위한 이미지 분석. 솔잎착즙분말 에탄올 추출물은 농도가 증가할수록 MCH-GFP의 발현이 증가함. 열수 추출물은 3.125ppm까지 MCH-GFP가 발현 하지만, 12.5ppm에서는 MCH-GFP의 발현이 감소함

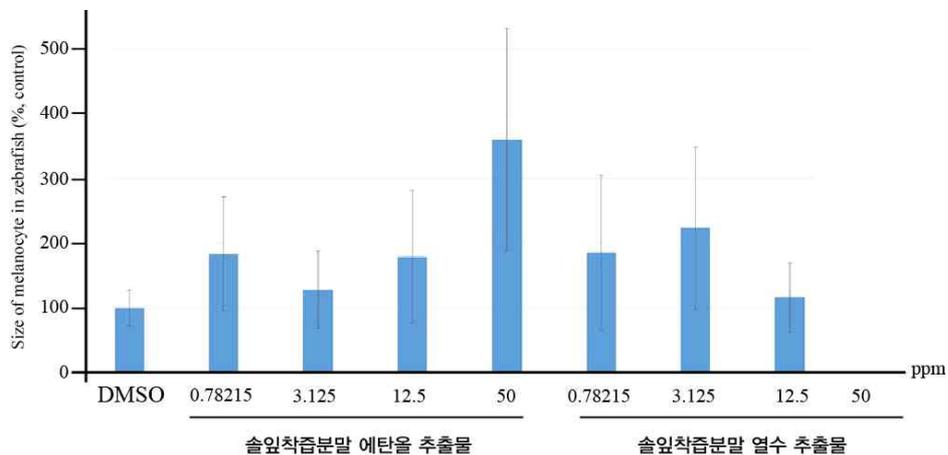


그림 28. 제브라피쉬에서 솔잎착즙분말의 식욕억제효능 평가. 솔잎착즙분말 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 제브라피쉬의 멜라닌소체 분산에 영향을 주지만, 열수 추출물의 3.125ppm에서 멜라닌소체 분산에 영향을 줌. 열수 추출물의 50ppm에서는 개체가 모두 죽었으며 12.5ppm에서는 일부 개체가 죽음.

## 제 4 절. 솔잎 착즙분말의 체지방 개선 효능 *In vivo* 연구

### 1. 솔잎착즙분말의 체지방 개선 효능 *In vivo* 분석

#### 가. 실험동물의 사육 및 식이

- (1) 실험동물은 4주령의 ICR 수컷 마우스를 7일간의 순환 사육기간을 거쳐  $23 \pm 3^\circ\text{C}$ , 상대습도는  $50 \pm 5\%$ , 조명시간은 12시간(오전 9시 점등 ~ 오후 9시 소등) 조건에서 사육함
- (2) 순환사육기간 동안 일반 증상을 관찰하여 증상이 없고 체중감소가 없는 건강한 동물을 난괴법에 따라 4그룹으로 분류함
- (3) 그룹 A는 일반식이 + 증류수(6마리), 그룹 B는 고지방식이 + 증류수(6마리), 그룹 C는 고지방식이 + 솔잎착즙분말 300mg/kg(7마리), 그룹 D는 고지방식이 + 솔잎착즙분말 500mg/kg(7마리) 군으로 분류함

#### 나. 식이조성

- (1) 일반식이와 고지방식이 방법은 모두 자유롭게 섭취하도록 하였으며 3 ~ 4일마다 동일한 시간에 식이급여량과 잔량을 측정하였으며, 증류수는 미세여과장치로 여과한 후 자유롭게 섭취시킴
- (2) 그룹 A, B는 증류수 100 ul 식이하였고, 그룹 C, D는 솔잎착즙분말 저농도(300mg/kg), 고농도(500mg/kg)로 체중에 맞게 증류수 100ul에 녹여 식이 함
- (3) 경구 투여는 매일 1회 동일 시간(18~19시 사이)에 경구 투여 하였으며, 실험기간 동안 체중변화를 관찰하여 각 군별 체중증가량을 비교함

#### 다. 투여방법

- (1) 존데(Sonde)를 이용한 경구투여를 실시하였으며(길이: 10 cm, 두께: 5 mm) 증류수는 증류기를 이용한 1차 증류수로서 Syringe filter를 이용하여 멸균한 증류수를 이용함

#### 라. 실험동물의 혈청시료 수집 및 분석

- (1) 혈액의 variation을 방지하기 위하여 혈액채취 하루(18시간) 전 절식을 시킴
- (2) 혈액채취를 위하여 쥐를 마취한 후 안구에서 혈액을 채취하였으며, 채취된 혈액은 즉시 Ice에서 꽂아 보관하였고 혈액을 채취한 후 저온원심분리기를 이용하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 12000 rpm에 15분간 원심분리 후 serum만을 분리함
- (3) 분리된 serum은  $-20^\circ\text{C}$ 에 보관하였으며, 혈액내의 total lipid, ALT(SGPT), AST(SGOT), total cholesterol, free fatty acid, HDL cholesterol, LDL cholesterol, total protein, triglyceride의 분석함 [시험분석기관 : GC 녹십자 랩셀]

#### 마. 백색지방 및 갈색지방 무게 측정

- (1) 실험에 사용된 다양한 샘플이 쥐에게 미치는 영향을 알아보기 위하여 지방 무게를 측정하고, 장기들의 형태와 병변여부를 관찰함
- (2) 체지방 감소 효과를 측정하기 위하여 부고환에 위치한 백색지방(white adipose tissue), 등과 목, 어깨 사이의 견갑부에 위치한 갈색지방(brown adipose tissue)의 무게를 측정함
- (3) 무게를 측정하기 위하여 18시간 절식시킨 후 부고환지방, 갈색지방조직 순으로 분리하였 지방 분

리와 동시에 각 장기들의 형태와 병변여부를 관찰 함

- (4) 분리된 각 지방조직은 microbalance를 이용하여 무게를 측정하였고, 백색지방 조직은 4% paraformaldehyde를 이용하여 고정함

바. 통계처리

- 각 결과에 대한 통계처리는 ONE-Way ANOVA를 분석하였으며 p 값은 0.05 이하일 때 유의적 차이가 있는 것으로 분석함. \* :  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

## 2. 솔잎착즙분말의 체지방 개선 효능 *In vivo* 분석 결과

가. 솔잎착즙분말 섭취에 따른 체지방 변화 분석

- (1) 솔잎착즙분말(300mg/kg, 500mg/kg)을 12주 동안 ICR 마우스에 경구 투여를 진행함

- 12주 후 최종 무게는 그룹 A(일반식이 + 증류수)의 무게는  $42.99 \pm 1.41$  g, 그룹 B(고지방식이 + 증류수)의 무게는  $48.55 \pm 3.54$  g, 그룹 C(고지방식이 + 솔잎착즙분말 저농도)의 무게는  $47.67 \pm 3.30$  g, 그룹 D(고지방식이 + 솔잎착즙분말 고농도)의 무게는  $37.05 \pm 2.39$  g으로 확인됨

- (2) 고지방식이 그룹 B는 12주 동안의 식이결과 정상적으로 비만이 유도되었음을 확인 할 수 있었으며, 12주 동안의 그룹 D는 그룹 B에 비하여 12주 식이 후 체중이 각각 11.5 g 적게 나가는 것을 확인함

- (3) 비만이 유도된 그룹 B는 식이 이후부터 꾸준히 무게가 증가하는 것을 확인 할 수 있었고 그룹 D는 식이 후 부터무게 증가량이 그룹 B에 비해 감소함을 확인함(그림 31)

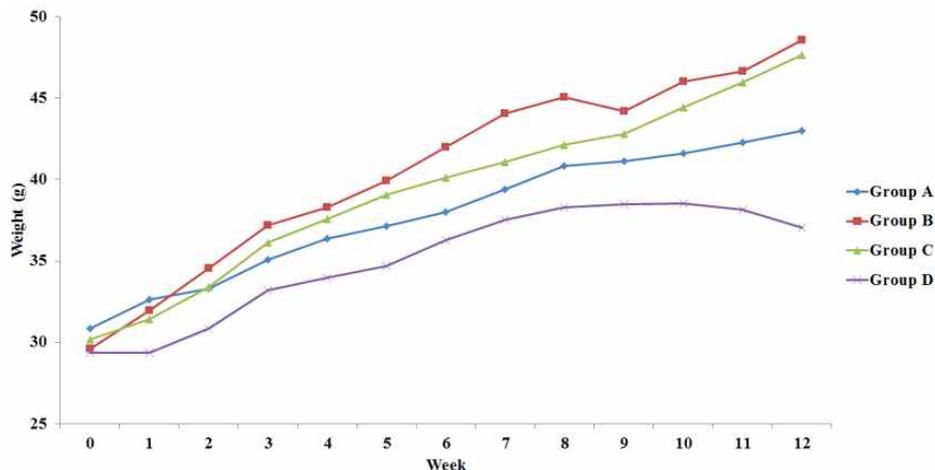


그림 31. 12주간 무게 변화 추이

- (4) 12주 동안 각 그룹의 무게 변화량은 그룹 A의 무게는  $12.14 \pm 0.98$  g, 그룹 B의 무게는  $18.94 \pm 3.86$  g, 그룹 C의 무게는  $17.49 \pm 2.49$  g, 그룹 D의 무게는  $7.66 \pm 2.30$  g으로 확인됨(그림 32)

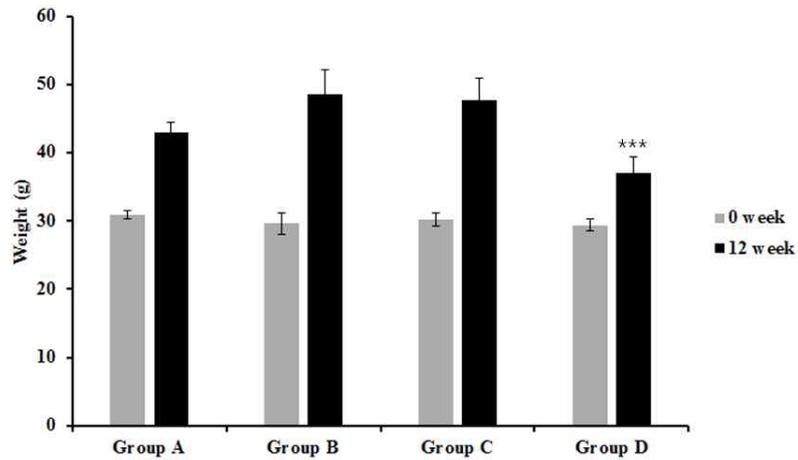


그림 32. 12주간 평균 무게 증가량. DIO vs 500mg/kg의  $p$  값은 0.001 이하로 Group B (DIO)와 유의적 차이를 나타냄

나. 솔잎착즙분말 섭취를 섭취한 쥐의 장기 병변 분석

(1) 12 주 동안의 식이 후 해부를 통해 내부 장기의 병변 유무를 육안으로 확인 한 결과 이상이 없음을 확인함(그림 33)

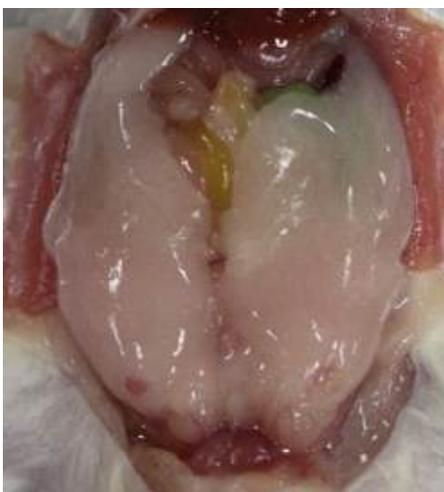
그룹A



그룹B



그룹C



그룹D



그림 33. 장기 내부 관찰

다. 술잎착즙분말 섭취를 섭취한 쥐의 백색지방과 갈색지방 분석

- (1) 백색지방을 채취하여 측정된 무게는 그룹 A  $0.62 \pm 0.05$  g, 그룹 B  $1.93 \pm 0.36$ , 그룹 C  $2.50 \pm 0.17$  g, 그룹 D  $0.56 \pm 0.13$  g으로 나타남(그림 34)

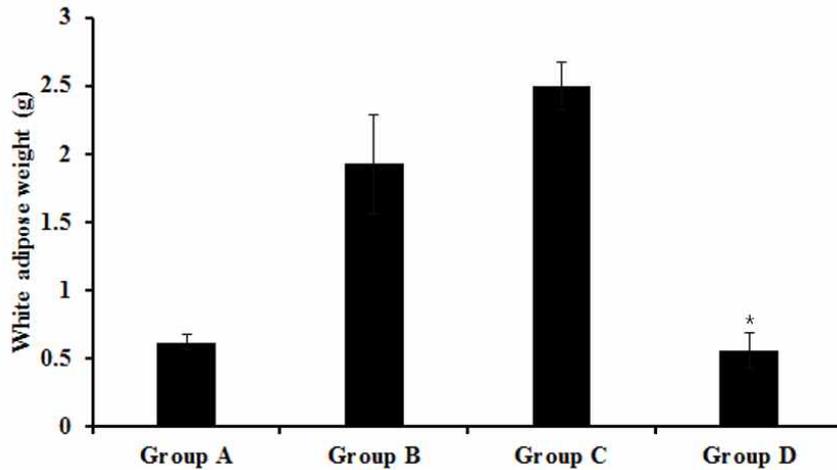


그림 34. 백색지방 무게 측정. DIO vs 500mg/kg의  $p$  값은 0.05 이하로 Group B (DIO)와 유의적 차이를 나타냄

- (2) 갈색지방조직(brown adipose tissue)의 무게는 그룹 A  $0.10 \pm 0.03$  g, 그룹 B  $0.16 \pm 0.01$ , 그룹 C  $0.14 \pm 0.02$  g, 그룹 D  $0.08 \pm 0.01$  g으로 나타남(그림 35)

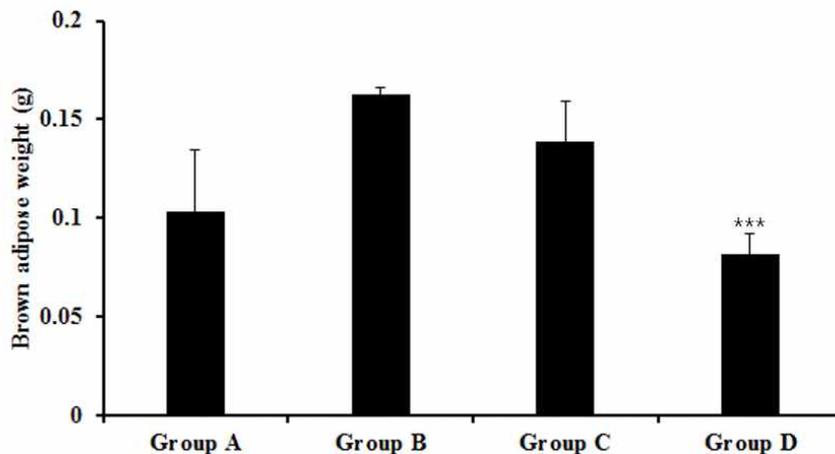


그림 35. 갈색지방 무게 측정. DIO vs 500mg/kg의  $p$  값은 0.001 이하로 Group B (DIO)와 유의적 차이를 나타냄

- (3) 12주간 술잎착즙분말을 섭취한 그룹은 비만 그룹 B보다 체내 백색지방의 무게가 적음을 알 수 있음. 이와 다르게 미토콘드리아가 많이 분포하여 지방대사에 영향을 끼치는 갈색지방조직의 무게도 그룹 D가 가장 작게 나타남

라. 술잎착즙분말 섭취를 섭취한 쥐의 혈액 분석

- (1) 각 그룹별 12주간의 식이 후 혈액 분석을 통하여 술잎착즙분말의 효과를 분석하기 위해 각 그룹의 혈액을 분석함
- (2) Total lipid의 경우 그룹 A는  $491.25 \pm 31.51$  mg/dL, 그룹 B는  $748.67 \pm 26.79$  mg/dL, 그룹 C는  $676.80 \pm 47.45$  mg/dL, 그룹 D는  $536.75 \pm 66.44$  mg/dL를 나타냄(그림 36)

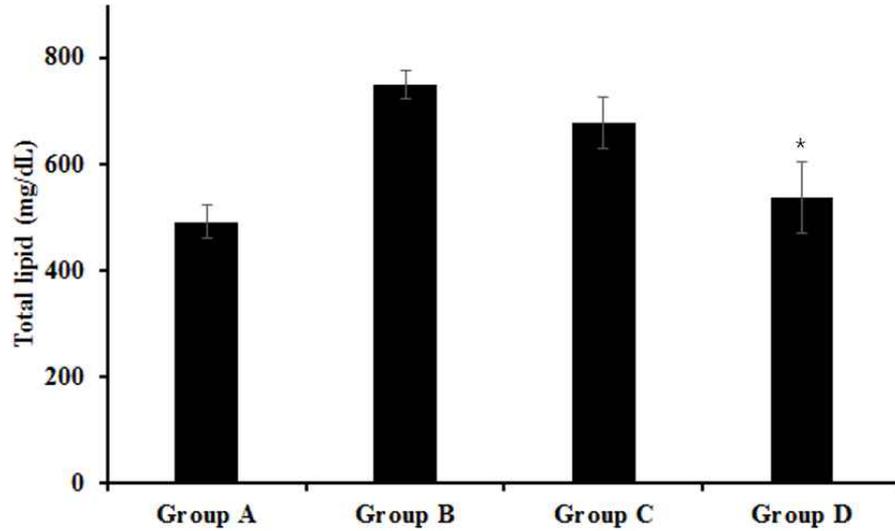


그림 36. 혈중 Total lipid 분석. DIO vs 500mg/kg의 p 값은 0.05 이하로 Group B (DIO)와 유의적 차이를 나타냄

- (3) Total cholesterol의 경우 그룹 A는  $132.67 \pm 9.29$  mg/dL, 그룹 B는  $225.67 \pm 4.19$  mg/dL, 그룹 C는  $240.60 \pm 26.80$  mg/dL, 그룹 D는  $170.25 \pm 27.77$  mg/dL을 나타냄(그림 37). HDL cholesterol의 경우 그룹 A는  $131.00 \pm 9.63$  mg/dL, 그룹 B는  $174.00 \pm 29.13$  mg/dL, 그룹 C는  $219.50 \pm 15.72$  mg/dL, 그룹 D는  $228.50 \pm 24.26$  mg/dL을 나타냄(그림 8). LDL cholesterol의 경우 그룹 A는  $11.00 \pm 1.22$  mg/dL, 그룹 B는  $38.00 \pm 5.89$  mg/dL, 그룹 C는  $38.67 \pm 8.28$  mg/dL, 그룹 D는  $34.00 \pm 4.39$  mg/dL을 나타냄(그림 38)

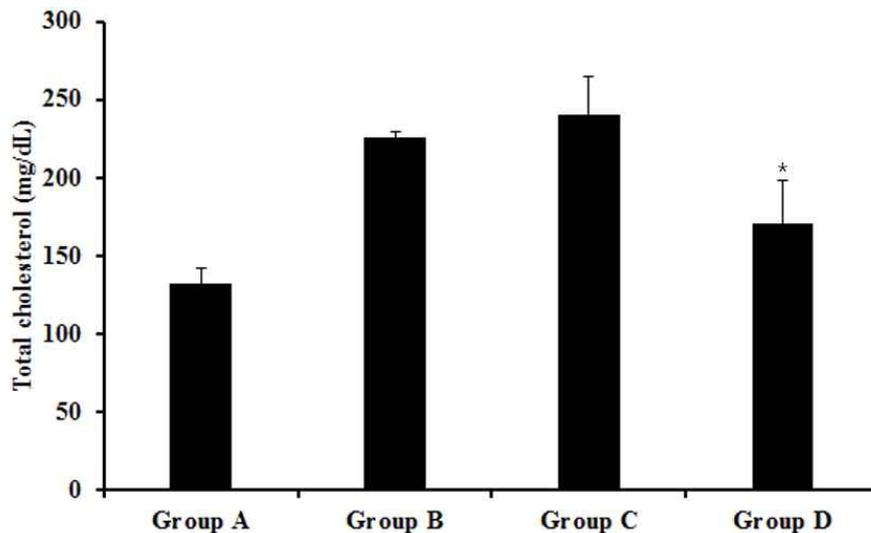


그림 37. 혈중 Total cholesterol 분석. DIO vs 500mg/kg의 p 값은 0.05 이하로 Group B (DIO)와 유의적 차이를 나타냄

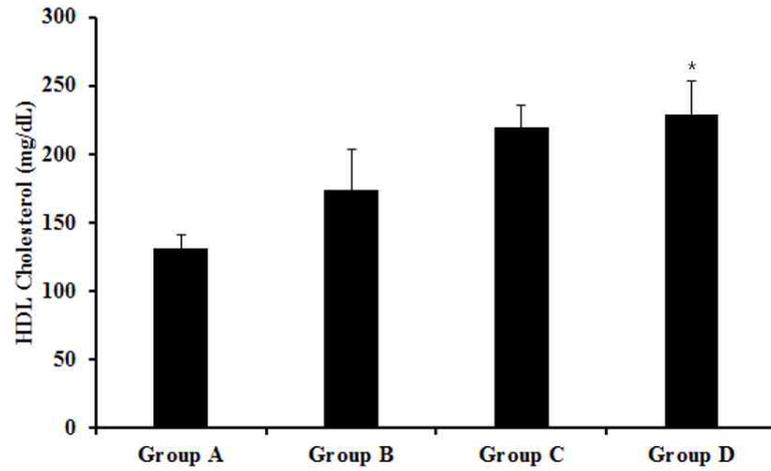


그림 38. 혈중 HDL cholesterol 분석. DIO vs 500mg/kg의 p 값은 0.05 이하로 Group B (DIO)와 유의적 차이를 나타냄

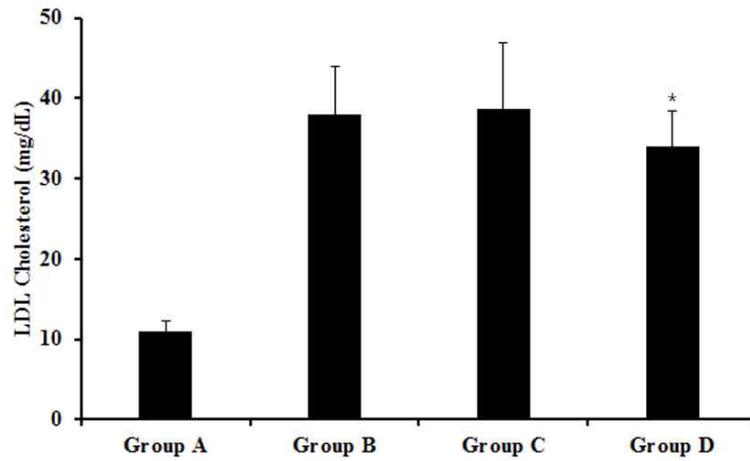


그림 39. 혈중 LDL cholesterol 분석. DIO vs 500mg/kg의 p 값은 0.05 이하로 Group B (DIO)와 유의적 차이를 나타냄

(4) Triglyceride의 경우 그룹 A는  $88.25 \pm 14.67$  mg/dL, 그룹 B는  $111.00 \pm 8.92$  mg/dL, 그룹 C는  $91.34 \pm 12.28$  mg/dL, 그룹 D는  $67.60 \pm 8.27$  mg/dL을 나타냄(그림 40)

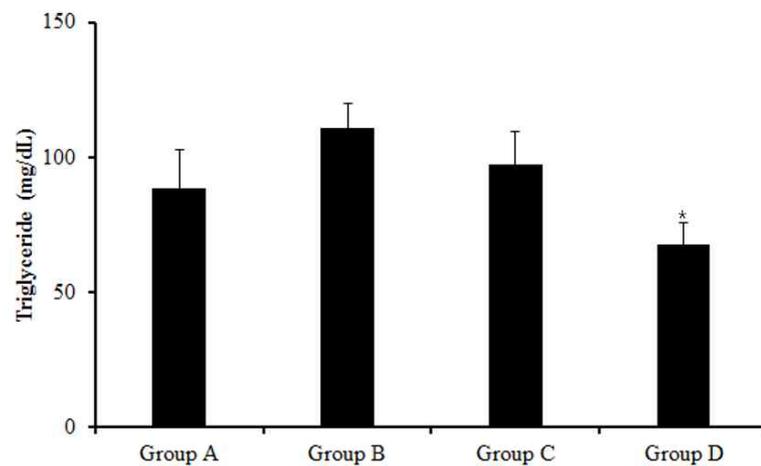


그림 40. 혈중 TG 분석. DIO vs 500mg/kg의 p 값은 0.05 이하로 Group B (DIO)와 유의적 차이를 나타냄

- (5) Free fatty acid의 경우 그룹 A는  $640.67 \pm 94.30 \mu\text{Eq/L}$ , 그룹 B는  $687.50 \pm 58.52 \mu\text{Eq/L}$ , 그룹 C는  $589.25 \pm 80.41 \mu\text{Eq/L}$ , 그룹 D는  $447.80 \pm 130.33 \mu\text{Eq/L}$ 을 나타냄(그림 41)

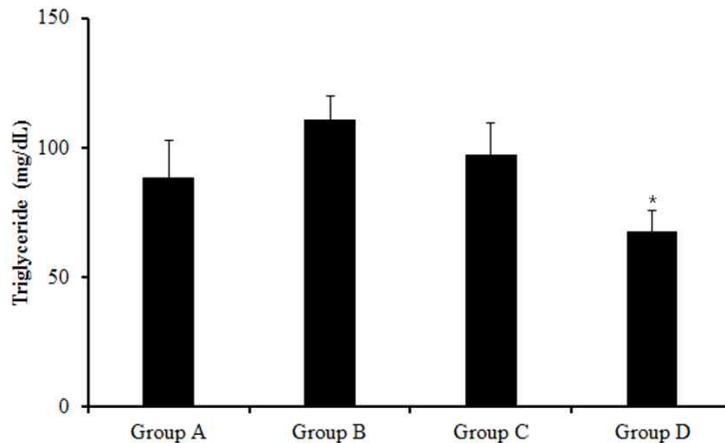


그림 41. 혈중 free fatty acid 분석. DIO vs 500mg/kg의 p 값은 0.05 이하로 Group B (DIO)와 유의적 차이를 나타냄

- (6) 기능 수치인 ALT(SGPT)에서 그룹 A는  $41.50 \pm 5.89 \text{ U/L}$ , 그룹 B는  $45.00 \pm 10.78 \text{ U/L}$ , 그룹 C는  $38.33 \pm 3.86 \text{ U/L}$ , 그룹 D는  $28.75 \pm 3.03 \text{ U/L}$ 를 나타내고(그림 42) 간기능 수치의 다른 지표인 AST(SGOT)에서 그룹 A는  $124.67 \pm 11.15 \text{ U/L}$ , 그룹 B는  $108.50 \pm 5.85 \text{ U/L}$ , 그룹 C는  $94.80 \pm 9.68 \text{ U/L}$ , 그룹 D는  $113.40 \pm 11.93 \text{ U/L}$ 를 나타냄(그림 42)

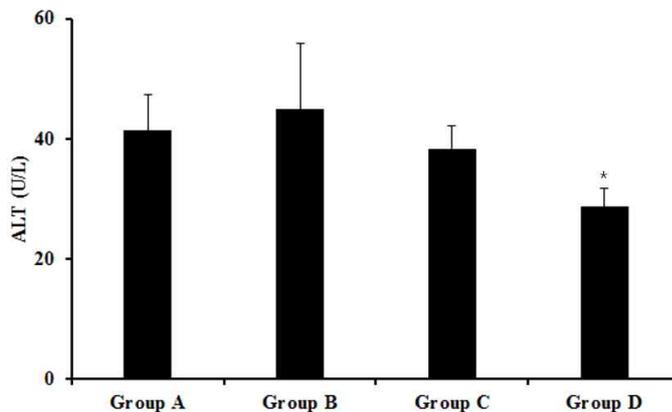


그림 42. 혈중 ALT(SGPT) 분석. DIO vs 500mg/kg의 p 값은 0.05 이하로 Group B (DIO)와 유의적 차이를 나타냄. 일반식이 vs 500mg/kg의 p 값은 0.05 이상으로 Group A (일반식이)유의적 차이가 나타나지 않음

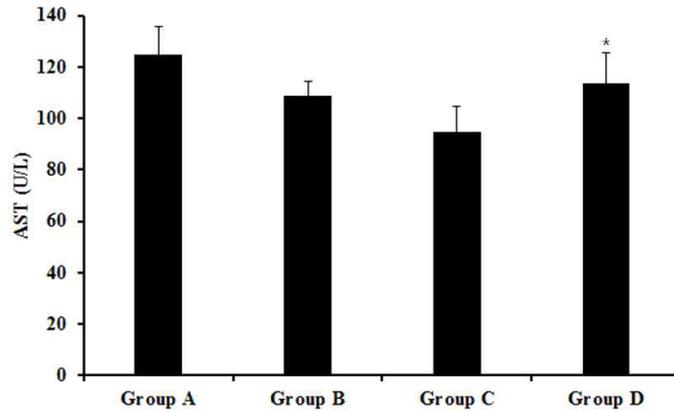


그림 43. 혈중 AST(SGOT) 분석. DIO vs 500mg/kg의 p 값은 0.05 이하로 Group B (DIO)와 유의적 차이를 나타냄. 일반식이 vs 500mg/kg의 p 값은 0.05 이상으로 Group A (일반식이)유의적 차이가 나타나지 않음.

- (7) Total protein의 경우 그룹 A는  $5.16 \pm 0.08$  g/dL, 그룹 B는  $5.14 \pm 0.38$  g/dL, 그룹 C는  $5.58 \pm 0.27$  g/dL, 그룹 D는  $5.63 \pm 0.32$  g/dL을 나타냄(그림 44)

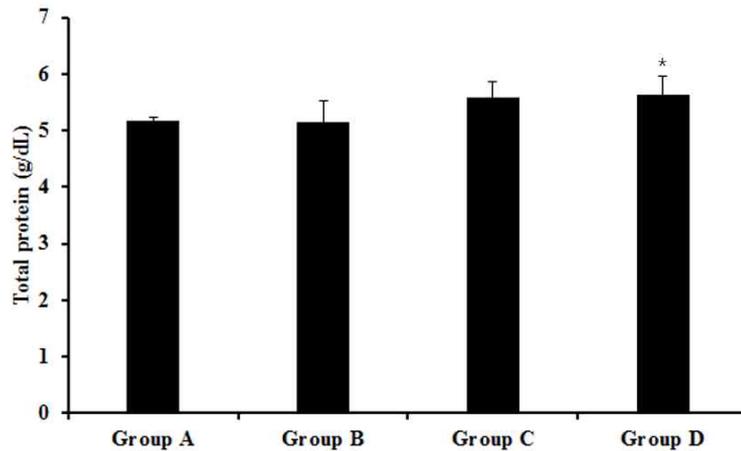


그림 44. 혈중 total protein 분석. DIO vs 500mg/kg의 p 값은 0.05 이하로 Group B (DIO)와 유의적 차이를 나타냄

- (8) 12주 동안 솔잎착즙분말을 섭취한 그룹 C와 D는 비만군인 그룹 B와 비교하였을 때 혈중 내 total lipid, free fatty acid, triglyceride의 감소를 확인 함
- (가) 혈중 total cholesterol과 LDL cholesterol의 경우에서도 감소함이 나타났으며, HDL cholesterol의 경우 증가함
- (나) Total protein의 수치는 유사하게 나타났으며, 간 기능 수치인 AST와 ALT는 일반식이군인 그룹 B와 유사하게 나타나 간 기능에 이상이 없는 것으로 나타남

## 제 5 절. 솔잎착즙분말의 체지방 개선 기전 연구

### 1. 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전세포에서 관련 유전자 발현 분석

#### 가. 실험방법

- (1) 3T3-L1 지방전구세포는 10% BCS(Bovine Calf Serum), 100unit/mL의 페니실린(penicilin) 및 100ng/mL의 스트렙토마이신(streptomycine)을 포함한 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, WELGENE, Korea) 배지에서 37°C 및 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양함
  - (가) 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포 분화를 유도하기 위해, 세포가 60mm 플레이트에 균일하게 자랐을 때 분화 유도물질인 MDI(10 $\mu$ g/mL insulin, 1 $\mu$ M dexamethasone 및 0.5mM IBMX(Sigma, USA)), 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 100unit/mL의 페니실린(penicilin) 및 100ng/mL의 스트렙토마이신(streptomycine)을 포함한 DMEM로 배지를 교체함
  - (나) 2일 간격으로 10 $\mu$ g/mL의 인슐린(insulin), 10% FBS(Fetal Bovine Serum), 100unit/mL의 페니실린(penicilin) 및 100ng/mL의 스트렙토마이신(streptomycine)을 포함한 DMEM 배지로 교체해주었으며, 6일간 분화를 유도함
  - (다) 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에 솔잎착즙분말을 처리 후 지방분화와 관련된 주요 유전자의 발현을 Real-time PCR을 이용하여 확인함
- 식품의약품안전처 체지방 감소 Bio-marker

aP2 : Fatty acid binding protein

SREBP-1 : Sterol regulatory element binding transcription factor 1

PPAR- $\gamma$  : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma

FAS : Fatty acid synthase

C/EBP- $\alpha$  : CCAAT/enhancer binding protein alpha

LPL : Lipoprotein lipase

#### 나. 실험결과

- (1) 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전세포에 솔잎착즙분말 열수추출물(PNEP water extract) 처리는 aP2, SREBP-1, PPAR- $\gamma$ , FAS, C/EBP- $\alpha$ , LPL의 발현을 농도 의존적으로 감소시킴
- (2) 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전세포에서 솔잎착즙분말 열수추출물이 aP2 발현에 미치는 영향
  - ① 솔잎착즙분말 열수추출물 100과 200 $\mu$ g/mL 처리 시 농도 의존적으로 aP2 발현을 억제시킴
  - ② 200 $\mu$ g/mL 처리는 control보다 발현이 약 2배가 더 감소함

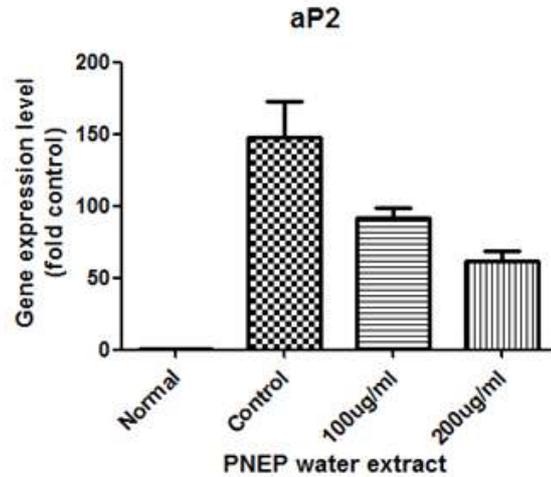


그림 45. 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에서 aP2 유전자 발현 분석. 솔잎착즙분말 열수추출물은 aP2 유전자의 발현을 농도 의존적으로 억제시킴.

- (3) 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전세포에서 솔잎착즙분말 열수추출물이 SREBP-1 발현에 미치는 영향
- ① 솔잎착즙분말 열수추출물 100과 200ug/mL 처리 시 농도 의존적으로 SREBP-1 발현을 억제시킴
  - ② 200ug/mL 처리는 control보다 발현이 약 1.5배가 더 감소함

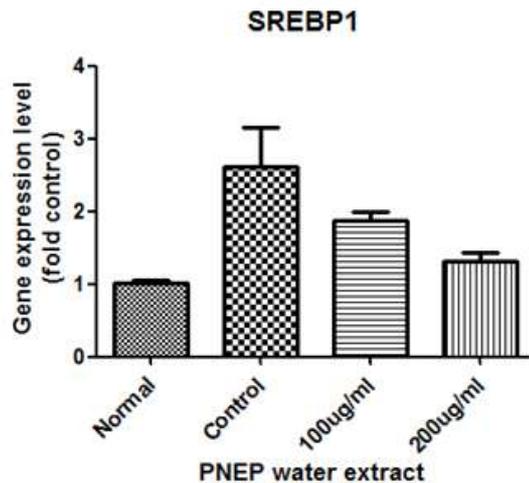


그림 46. 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에서 SREBP-1 유전자 발현 분석. 솔잎착즙분말 열수추출물은 SREBP-1 유전자의 발현을 농도 의존적으로 억제시킴.

- (4) 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전세포에서 솔잎착즙분말 열수추출물이 LPL 발현에 미치는 영향
- ① 솔잎착즙분말 열수추출물 100과 200ug/mL 처리 시 농도 의존적으로 LPL 발현을 억제시킴
  - ② 100ug/mL 처리는 Normal 수준으로 발현이 억제됨
  - ③ 200ug/mL 처리는 LPL 발현이 강하게 억제됨

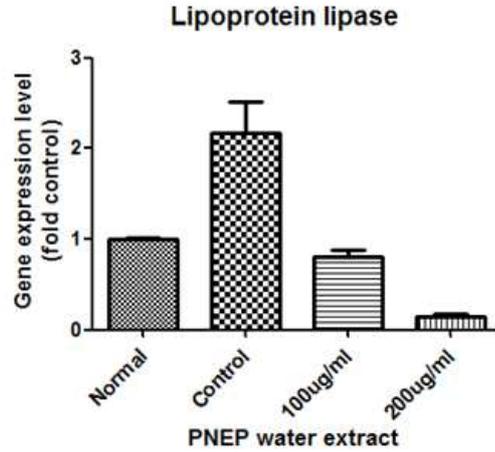


그림 46. 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에서 LPL 유전자 발현 분석. 솔잎착즙분말 열수추출물은 LPL 유전자의 발현을 농도 의존적으로 억제시킴.

(5) 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전세포에서 솔잎착즙분말 열수추출물이 PPAR- $\gamma$  발현에 미치는 영향

- ① 솔잎착즙분말 열수추출물 100과 200ug/mL 처리 시 농도 의존적으로 PPAR- $\gamma$  발현을 억제시킴
- ② 100ug/mL 처리는 약 1.5배 발현이 억제됨
- ③ 200ug/mL 처리는 PPAR- $\gamma$  발현을 Normal 수준으로 발현을 억제시킴

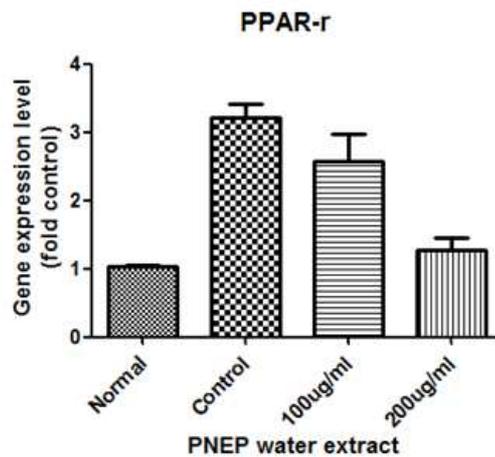


그림 47. 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에서 PPAR- $\gamma$  유전자 발현 분석. 솔잎착즙분말 열수추출물은 PPAR- $\gamma$  유전자의 발현을 농도 의존적으로 억제시킴.

(6) 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전세포에서 솔잎착즙분말 열수추출물이 FAS 발현에 미치는 영향

- ① 솔잎착즙분말 열수추출물 100과 200ug/mL 처리 시 FAS의 발현을 강하게 억제시키며 발현수준은 Normal 수준으로 감소함

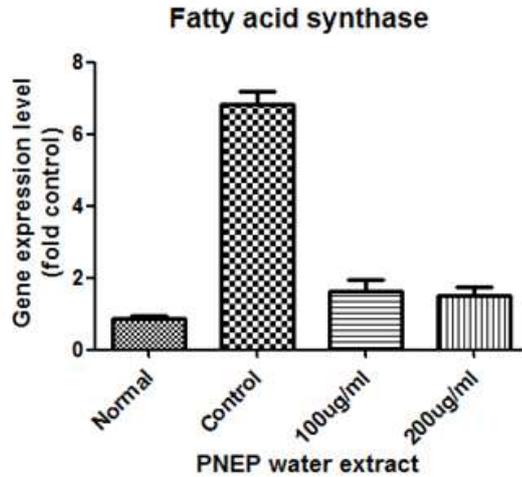


그림 48. 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에서 FAS 유전자 발현 분석. 솔잎착즙분말 열수추출물은 FAS 유전자의 발현을 강하게 억제시킴.

- (7) 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전세포에서 솔잎착즙분말 열수추출물이 C/EBP- $\alpha$  발현에 미치는 영향
- ① 솔잎착즙분말 열수추출물 100과 200ug/mL 처리 시 농도 의존적으로 C/EBP- $\alpha$  발현을 억제시킴
  - ② 100ug/mL 처리는 약 1.5배 발현이 억제됨
  - ③ 200ug/mL 처리는 약 2배 발현이 억제됨

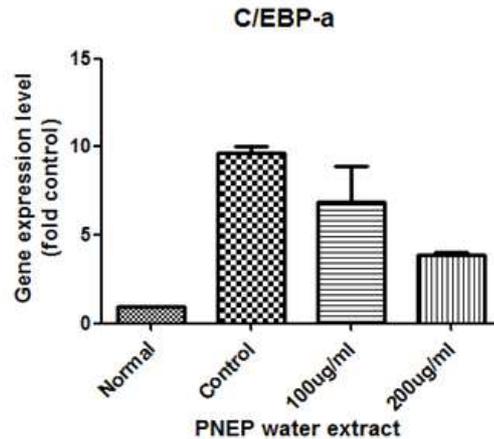


그림 49. 지방분화가 유도된 3T3-L1 지방전구세포에서 C/EBP- $\alpha$  유전자 발현 분석. 솔잎착즙분말 열수추출물은 C/EBP- $\alpha$  유전자의 발현을 농도 의존적으로 억제시킴.

## 2. 비만이 유도된 쥐의 지방조직에서 관련 유전자 발현 분석

### 가. 실험방법

- (1) *In vivo* 분석에서 비만이 유도된 쥐의 지방세포에서 Leptin의 발현을 Real-time PCR을 이용하여 분석
- (2) 분석에 사용된 그룹
  - (가) Group A : 일반식미 + 증류수
  - (나) Group B : 고지방식이 + 증류수

(다) Group C : 고지방식이 + 솔잎착즙분말 300mg/kg

(나) Group B : 고지방식이 + 솔잎착즙분말 500mg/kg

나. 실험결과

- (1) 솔잎착즙분말 300mg/kg(Group C)를 섭취한 비만 쥐의 Leptin 발현은 약 1.5배 감소함
- (2) 솔잎착즙분말 500mg/kg(Group D)를 섭취한 비만 쥐의 Leptin 발현은 약 2배 감소하였고 Leptin의 발현량은 Group A(정상 쥐)의 발현 수준으로 감소 됨

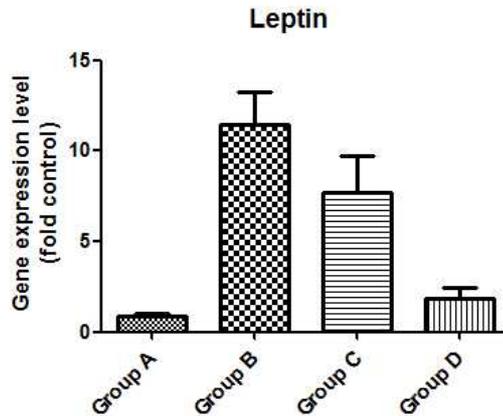


그림 50. 고지방식이를 통해 비만이 유도된 쥐의 지방조직에서 Leptin 유전자 발현 분석. 솔잎착즙분말은 Leptin 유전자의 발현을 농도 의존적으로 억제시킴. 솔잎착즙분말 500mg/kg(Group D)을 섭취한 비만 쥐의 Leptin은 정상 쥐(Group A)의 Leptin 발현 수준으로 감소됨

## 제 6 절. 임상시험을 통한 솔잎착즙분말의 체지방 개선 효능 검증

### 1. 인체적용시험 시료 제작

#### 가. 시험군

순번	원료명	배합비(%)	1캡슐 mg	1일섭취량
1	솔잎착즙분말	99.010	500.0005	3000.0030
2	스테아린산마그네슘	0.990	4.9995	29.9970
3	서흥담갈색0호(81A/81A)			

#### 나. 대조군

순번	원료명	배합비(%)	1캡슐 mg	1일섭취량
1	유당혼합분말	99.010	500.0005	3000.0030
2	스테아린산마그네슘	0.490	2.4745	14.8470
3	그린칼라	0.300		
4	치자황색소	0.100		
5	솔향분말	0.100		
6	서흥담갈색0호(81A/81A)			



그림 51. 인체적용시험 시료

## 2. 식품의약품안전처 모듬토의

가. 장소 : 오송 식품의약품안전처

나. 목적 : 지표물질 선정 및 인체적용시험 진행, 결과 분석에 관한 토의

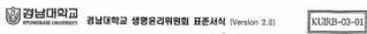


그림 52. 식품의약품안전처 모듬토의 진행

## 3. IRB 심의 신청 및 인체적용시험 진행

가. 의료기관 선정 : 마산의료원 (DEXA 분석장비 보유)

나. IRB 심의 신청 및 연구대상자 모집

<p style="text-align: center;">   <b>연구 계획서(인간대상연구용)</b>          ver 1.1       </p> <p style="text-align: center;"> <b>연구제목: 임상시험을 통한 솔잎 착즙분말의 체지방 개선 효능 검증</b> </p> <p style="text-align: center;">         경남대학교 식품영양생명학과 교수 박은주          경남대학교 식품영양생명학과 조교수 박재희          경남대학교대학원 첨단공학과 석사과정 천다휘       </p> <p style="text-align: center;"> <b>ALID DURATION</b>          2017.03.20 2018.03.20          UNGNAM UNIVERSITY IRB       </p>	<p style="text-align: center;">   <b>연구대상자용 설명문</b> </p> <p>         비만은 만성질환의 주요원인으로 작용한다고 알려져 있습니다. 본 조사에서는 저중량 양을 원하는 성인 여성들에게 도움을 드리고자 영양중재활동은 실시하게 되었습니다. 귀하께서 답변하시는 내용은 보다 나은 저중량양 관리방안을 마련하는 귀중한 자료로 활용될 것입니다.       </p> <p>         본 설문조사는 학술적 목적의 조사이므로 쓰이지 않으며 여러분의 응답내용은 절대 비밀이 보장됩니다. 질문의 내용은 좋고 그른 답이 없으니 각 문항에 대한 여러분의 평소 생각과 행동을 솔직하고 빠짐없이 응답해 주시길 바랍니다. 바쁘신 중에도 본 연구에 참여하여 주신 것에 대하여 진심으로 감사드립니다.       </p> <p style="text-align: right;">         경남대학교 식품영양생명학과 교수 박은주          (055-549-2218, 010-5429-1840)          대학원생 천다휘 010-8252-6007          (문의사항이 있으시면 언제든지 연락주시기 바랍니다.)       </p> <p> <b>연구목적:</b> 임상시험을 통한 솔잎착즙분말의 체지방 개선 효능 검증       </p> <p>         본 연구는 저중량양을 원하는 20~40세 미만(BMI=25)의 성인 과체중/비만 성인을 대상으로 하며, 체지방을 줄이기 위하여, 체지방의 증가, 체중의 증가, 식욕을 증진시켜 줌으로써, 이 연구에 참여하시기를 원합니다. 이 연구가 왜 수행되며, 무엇을 수행하는지 귀하가 이해하는 것이 중요합니다. 이 연구를 수행하는 박은주 연구책임자 또는 천다휘 연구원이 귀하에게 이 연구에 대해 설명해 줄 것입니다. 이 연구는 지랄적으로 참여 의사할 때만 참여할 수 있으며, 필요할 때 참여를 중단할 수 있습니다. 다음 내용을 신중히 읽어보신 후 참여 의사를 밝혀 주시길 바라며, 필요하면 전화로 문의하시거나 연구결과를 위해 보실지도 모릅니다. 단, 어떠한 경우에도 본 연구에 참여하여 자제하지 않습니다.       </p> <p>         귀하의 서명은 귀하가 본 연구에 대해 그리고 위험성에 대해 설명을 들었음을 의미하며, 이 문서에 대한 귀하의 서명은 귀하께서 자신(또는 법정대리인)이 본 연구에 참가를 원한다는 것을 의미합니다.       </p> <p> <b>I. 연구의 배경과 목적</b> </p> <p>         솔잎의 생리 활성에 관한 연구는 솔잎 추출물의 항산화활성, 면역 활성, 항비만, 지질대사관련 효과 등에 수행이 보고되었습니다. 2014년 국민건강영양조사에 따르면, 비만 유병률(대중량 기준)은 23.9%       </p> <p style="text-align: right;"> <b>ALID DURATION</b>          2017.03.20 2018.03.20          UNGNAM UNIVERSITY IRB       </p>
<p style="text-align: center;"> <b>연구계획서</b> </p> <p style="text-align: right;">No. □□</p> <p style="text-align: center;"> <b>“임상시험을 통한 솔잎착즙분말의 체지방 개선 효능 검증” 연구 참여 대상자 기초자료 조사</b> </p> <p>         안녕하십니까? 본 설문지는 농림수산식품기술개발사업의 지원으로 수행된 솔잎의 저중량 양에 미치는 영향 연구용 기초 자료를 이용하고자 하는 설문지입니다.       </p> <p>         본 설문지는 학술적 목적의 조사이므로 쓰이지 않으며 여러분의 응답내용은 절대 비밀이 보장됩니다. 질문의 내용은 좋고 그른 답이 없으니 각 문항에 대한 여러분의 평소 생각과 행동을 솔직하고 빠짐없이 응답해 주시길 바랍니다.       </p> <p>         바쁘신 중에도 본 연구에 참여하여 주신 것에 대하여 진심으로 감사드립니다.       </p> <p style="text-align: right;">         경남대학교 식품영양생명학과 교수 박은주          연락처: 055-549-2218, 010-5429-1840          (문의사항이 있으시면 언제든지 연락주시기 바랍니다.)       </p> <p> <b>◆ 일반사항 ◆</b> </p> <p>         1. 귀하의 성별은? ① 남 ( ) ② 여 ( )          2. 연령:          3. 계층:          4. 현재권력은? ( ) 남 ( ) 세 중 ( ) 세          5. 자신은 비만이라고 생각합니까?          ① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다 ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.       </p> <p> <b>◆ 조사 방법 ◆</b> </p> <p>         1. 자신의 생활패턴에 관계없음?          ① 결석 ② 과식 ③ 불규칙적인 식사 ④ 영양불균형 ⑤ 과다한 간식       </p> <p>         2. 식사는 규칙적으로 하십니까?          ① 매우 그렇다. ② 그렇다. ③ 보통이다 ④ 그렇지 않다. ⑤ 전혀 그렇지 않다.       </p> <p>         3. 자신에게 가장 중요한 식사 시간은?          ① 아침식사 ② 점심식사 ③ 저녁식사       </p> <p>         4. 아침식사는 하십니까?          ① 아침식사를 한다. ② 아침식사를 하지 않는다.       </p> <p>         5. 식사를 거르는 이유는 무엇입니까?  <b>ALID DURATION</b>          2017.03.20 2018.03.20          UNGNAM UNIVERSITY IRB       </p> <p style="text-align: center;"> <b>설문지 및 섭취기록지</b> </p>	<p style="text-align: center;"> <b>설명문 및 동의서</b> </p> <p style="text-align: center;"> <b>“임상시험을 통한 솔잎착즙분말의 체지방 개선 효능 검증” 인체적용시험에 참여 할 피험자를 모집합니다.</b> </p> <p>         연구목적: 임상시험을 통한 솔잎 착즙분말의 체지방 개선 효능 검증       </p> <p> <b>1. 설문 목적:</b> </p> <p>         본 연구는 2016년도 농림수산식품사업의 일환으로 수행된 솔잎의 저중량 양에 미치는 영향 연구용 기초 자료를 이용하고자 하는 설문지입니다.       </p> <p> <b>2. 자격요건</b> </p> <p>         - 저중량양을 원하는 20~40세 미만(BMI=25)       </p> <p> <b>&lt;대상자 선정시 제외기준&gt;</b> </p> <p>         ① 과거에 심각한 질환을 앓았거나 현재 심각한 질환으로 치료중인 환자          ② 임신부 및 수유부          ③ 고혈압, 당뇨, 갑상선 질환을 앓고 있는 자          ④ 최근에 알콜을 마실 수 있는 약물(지니알, 리덕탈, 이노제, 항우울제, 식욕억제제) 복용 중인 자          ⑤ 심각한 인 비만으로 인해 참여하는 자          ⑥ 저중량양을 위해 위장술, 장문폐쇄 등의 수술 경험이 있는 자          ⑦ 간기능 장애(ALT, AST, 알부민 수치)를 2.5배 이상 상승)를 가진 자          ⑧ 신기능 장애(크레아티닌 정상 수치 초과)를 가진 자          ⑨ 임신중, 임신 중양행의 위험이 있는 자          ⑩ 시험참여에 동의한 후 임의 중단에 동의한 자       </p> <p> <b>3. 대상자 모집기간:</b> </p> <p>         2016년 2월 15일 ~ 3월 31일까지       </p> <p> <b>4. 시험의 특성과 인체적용 기간:</b> </p> <p> <b>ALID DURATION</b>          2017.03.20 2018.03.20          UNGNAM UNIVERSITY IRB       </p> <p>         실험 시료: 본 연구에 사용될 시험재료들은 솔잎을 직접한 후 분쇄한 시료로 함유 함량에 따라 다르다.       </p> <p> <b>인체적용기간:</b> 시작일로부터 12주간 동안 전신통계 예정임. 다음 시작 일에 따라 종료 기간은 다음과 같음       </p> <p>         ① 2017년 3월 15일(수)~2017년 6월 7일(수)까지 12주간이며, 총 3회 체중 측정          ② 2017년 3월 22일(수)~2017년 6월 14일(수)까지 12주간이며, 총 3회 체중 측정       </p> <p> <b>5. 선별방법:</b> </p> <p>         참여의사가 있는 자들에게 인체적용시험의 목적과 방법에 대한 상세한 설명을 한 후, 동의서에 서명한 지원자를 대상으로 피험자를 선별함.       </p> <p> <b>6. 지원방법 및 문의사항</b> </p> <p>         참가 인체적용시험에 참여하고자 하는 지원자는 경남대학교 식품영양생명학과 연구원 천다휘 (010-8252-6007)로 연락주시기 바랍니다. 자세한 정보 및 문의사항은 연구시간 (평일 9시 ~ 6시, 휴일) 중 상시 연락처로 문의하여 주시기 바랍니다.       </p> <p>         * 문의처는 다음과 같습니다: 경남대학교 건강과학관 3층 영양영양생명학과.       </p>

다. 인체적용시험을 통한 체지방 개선 효능 검증

(1) 임상시험을 통한 솔잎착즙분말의 체지방 개선 효능 검증

(가) 연구설계

- ① 본 연구는 과체중(BMI 25-30 kg/m<sup>2</sup>) 대상자에게 솔잎착즙분말캡슐을 섭취한 솔잎 군, 위약캡슐을 섭취한 플라시보군의 비만대사 및 항산화 대사 개선 효능과 솔잎착즙분말의 생체 이용률에 미치는 효과를 파악하기 위해 무작위 배정법, 이중 맹검법, 위약-대조군 임상시험을 실시함
- ② 과학적, 윤리적 연구 진행을 위해 경남대학교 생명윤리위원회(Institutional Review

Board IRB)의 승인을 받았으며(승인번호 : 1040460-A-2017-002), 모든 대상자에게 연구방법 및 동의서에 관한 내용을 설명한 후, 본인의 자유의사에 따라 연구 참가 동의서를 문서로 받음

(나) 연구대상자 선정 및 영양중재

① 과체중(BMI 25-30 kg/m<sup>2</sup>) 대상자에서 기능성 비만대사 및 항산화 대사 개선 효능과 솔잎착즙분말의 생체 이용률에 미치는 영향을 측정하기 위하여 실험시작 전 1주 동안 솔잎함유 식품과 혈압에 영향을 미칠 수 있는 건강기능식품 등의 섭취를 제한시키는 wash out 기간(고갈식이 기간)을 거쳐 무작위로 플라시보군과 솔잎군으로 나누어 12주간 영양중재를 실시함

② 식약처 모듈토의 시 제안된 대상자 수는 각 그룹별 60명으로 총 120명이었음. 그러나 비만관련 선행연구 중 19-65세의 BMI 23 kg/m<sup>2</sup> 이상인 과체중 여성 114명을 대상으로 12주간 대조군과 L-carnitin, soflavone 보충 섭취의 영양중재를 실시한 Gwak의 연구를 참고하였을 때, 보충 섭취 0주 체지방은 34.1±0.66에서 12주 후 33.5±0.68으로 유의하게 감소하여 섭취 전후의 효과 크기가 0.6이었음. 이를 DIFF 값으로 활용한 결과,

$$n = (1.96+0.84)^2 \times 2 \times 0.68^2 / 0.6^2 \quad n=20$$

표본의 크기는 군당 20명이나,

추적손실률 5%와 대상자의 순응도 80%를 감안하여

$$n = 20 \div [(1-0.05) \times 0.8] = 26$$

따라서 최소 52명(각 군당 26명)의 피험자가 필요함

③ 스크리닝된 대상자들은 총 60명이었으나, 그 중 8명은 BMI 수준이 과체중(BMI 25-30 kg/m<sup>2</sup>) 범위보다 높아 제외되어 솔잎군 26명, 플라시보군 26명으로 연구를 진행함

④ 연구 진행 중 각 그룹별 탈락자가 6명씩 발생하여, 플라시보군 20명, 솔잎군 20명으로 연구를 완료함(그림 53)

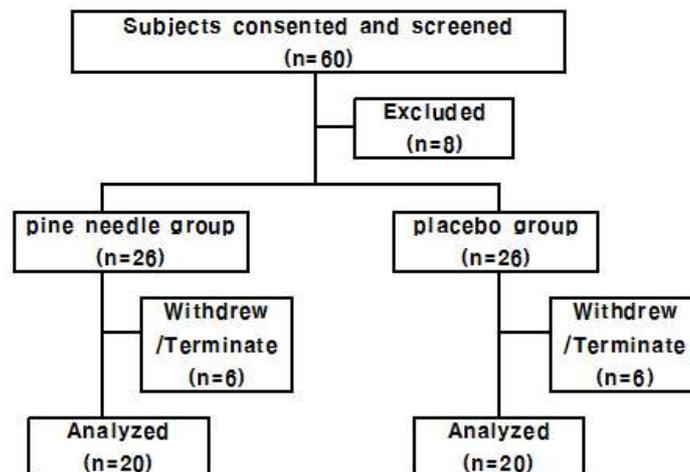


그림 53. Consort(Consolidated standards of reporting trials) flow diagram

(다) 대상자의 일반사항(신체적 특성)

① 대상자의 일반사항을 비교해 보았을 때(Table 24), 남녀비율은 솔잎군 남자 12명, 여

- 자 8명, 플라시보군 남자 11명 여자 9명이 시험에 참여함
- ② 대상자의 평균 연령은 솔잎군 23.4 ± 1.6세, 플라시보군 22.75 ± 0.9세였으며, 키는 솔잎군 168.2 ± 2.3 cm, 플라시보군 169.5 ± 1.9 cm로 각 일반사항의 유의적인 차이는 없음
- ③ 대상자들의 캡슐 섭취 전후 체중과 DEXA를 통한 BMI, AP spine, left femur 수준 및 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리-엉덩이둘레비, 수축기, 이완기 혈압을 확인한 결과 (Table 25), 체중과 BMI, AP spine, left femur 수준은 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 허리둘레, 엉덩이둘레에서 솔잎섭취 전과 비교하여 섭취 12주 후에 유의적으로 감소함
- ④ 섭취 12주 후 플라시보군에서 수축기 혈압이 유의적으로 증가하는 반면, 솔잎 섭취 12주 후 수축기 및 이완기 혈압 수준이 유의적으로 감소하여 솔잎의 섭취가 수축기 및 이완기 혈압의 감소에 긍정적인 영향을 나타내는 것을 확인함
- ⑤ 높은 연령대가 아닌 20대의 낮은 연령에서 수축기 혈압 및 이완기 혈압이 높다는 것을 확인할 수 있는 계기가 되었으며, 추후 20-30대의 혈압 조절에 영향을 미칠 수 있는 추가 연구에 대한 가능성을 확인함

Table 24. Characteristics of the subjects

	Pine needle	Placebo
Subjects(n)	20	20
Sex(n)		
Male	12	11
Female	8	9
Age(years)	23.4±1.6 <sup>1)ns2)</sup>	22.75±0.9
Height(cm)	168.2±2.3 <sup>ns</sup>	169.5±1.9

1)Mean ± S.E.

2)ns: not significantly different at p<0.05 after Student' s t-test between group

Table 25. Effect of pine needle supplementation on body weight, BMI and body fat, waist, hip circumference, WHR and blood pressure.

	Group	Week		
		0	6	12
Weight(kg)	Pine needle	80.2±2.9 <sup>2)ns3)</sup>	82.3±2.9	81.4±2.9
	Placebo	77.2±2.5 <sup>ns</sup>	78.1±2.7	77.9±2.5
DEXA <sup>1)</sup>				
BMI(kg/m <sup>2</sup> )	Pine needle	27.7±0.6	-	28.2±0.6
	Placebo	27.1±0.4	-	27.4±0.4
AP spine(%)	Pine needle	27.8±1.4	-	27.8±1.5
	Placebo	25.6±1.7	-	26.6±1.6
Left femur(%)	Pine needle	21.6±0.9	-	21.5±1.0

	Placebo	21.6±1.6	-	22.1±1.5
Waist(cm)	Pine needle	93.1±1.6 <sup>ns</sup>	90.9±1.7	88.3±1.7*
	Placebo	89.2±1.6 <sup>ns</sup>	86.9±1.5	87.4±1.3
Hip(cm)	Pine needle	105.1±1.3 <sup>ns</sup>	103.7±1.3	101.3±1.4*
	Placebo	102.4±0.9 <sup>ns</sup>	101.8±0.9	101.9±1.1
WHR	Pine needle	0.89±0.01 <sup>ns</sup>	0.88±0.01	0.87±0.01
	Placebo	0.87±0.01 <sup>ns</sup>	0.85±0.01	0.86±0.01
SBP(mmHg)	Pine needle	140.1±3.4 <sup>ns</sup>	138.4±3.5	130.2±2.9*
	Placebo	134.5±2.5 <sup>a4)</sup>	135.3±2.9 <sup>ab</sup>	142.1±2.2 <sup>c*</sup>
DBP(mmHg)	Pine needle	86.0±2.5 <sup>ns</sup>	84.7±2.5	81.5±2.0*
	Placebo	82.1±1.8 <sup>ns</sup>	80.6±1.8	82.9±1.9

1)DEXA; dual-energy X-ray absorptiometry, BMI; body mass index, WHR; waist to hip ratio

2)Mean ± S.E

3)ns: not significantly different at  $p < 0.05$  after Student's  $t$ -test between group

\*Significant difference between periods (0w vs. 6w or 0w vs. 12w) by paired  $t$ -test  $p < 0.05$

(라) 식이 섭취 조사

- ① 대상자의 캡슐 섭취 전후 식이섭취량을 24시간 회상법으로 조사하였을 때(Table 26), 솔잎군에서 탄수화물, 철, 나트륨, 칼륨, 아연 항목과 플라시보군에서 인, 나트륨, 칼륨 항목에서 섭취전후에 따른 유의적인 차이를 보였으나, 이는 식이섭취에 의한 변화로 예측되며, 솔잎 캡슐 및 플라시보 캡슐에 의한 영향으로 보이지 않음
- ② 솔잎군과 플라시보군의 0주와 12주 영양소 섭취 수준은 거의 유사한 상태로 나타남

Table 26. Daily nutrient intakes of the subjects

	Pine needle		Placebo	
	0w	12w	0w	12w
<b>Energy nutrients</b>				
Calorie(kcal)	1829.8±152.8 <sup>1)</sup>	1539.3±190.9	1710.5±108.9	1710.0±111.4
Carbohydrate(g)	272.5±22.5	193.1±20.1*	237.6±17.7	253.4±17.1
Protein(g)	61.7±5.9	49.2±7.4	67.3±7.0	59.4±5.3
Fat(g)	54.3±5.7	42.4±6.0	50.8±5.3	47.7±3.9
<b>Minerals</b>				
Calcium(mg)	353.1±42.4	268.2±37.4	334.4±36.9	341.2±47.9
Phosphorus(mg)	451.4±91.3	651.0±90.9	410.1±44.0	804.0±63.6*

Iron(mg)	14.4±1.9	10.1±1.5*	13.9±2.0	13.6±1.5
Sodium(mg)	903.0±85.5	2403.1±260.6*	953.3±88.9	3156.1±330.2*
Potassium(mg)	3556.2±387.6	1365.6±175.3*	3022.4±262.1	1854.4±150.5*#
Zinc(mg)	8.5±0.9	6.3±0.8*	8.3±0.8	7.9±0.6
<b>Vitamins</b>				
Vitamin A(µg RE)	588.1±211.7	285.4±48.8	412.3±60.4	352.2±44.4
Retinol(µg)	343.2±205.1	106.9±15.2	73.5±12.2	100.9±18.0
β-carotene(µg)	2938.6±366.2	2142.0±487.6	4066.0±726.2	3015.6±457.7
Vitamin D(mg)	3.3±1.4	1.3±0.2	2.1±0.8	1.7±0.4
Vitamin E(mg)	17.5±1.7	13.2±2.3	15.8±1.7	13.7±1.3
Vitamin K(mg)	140.2±37.2	80.4±24.7	176.2±36.3	104.6±17.9
Vitamin C(mg)	61.0±12.6	28.9±5.5	47.3±9.7	38.7±5.8

1) Mean ± S.E

\*Significant difference between periods (0w vs. 12w) by paired *t*-test  $p < 0.05$

#Significantly different at  $p < 0.05$  after Student' s *t*-test between group

(마) 지질대사 관련 지표 및 생화학적 지표 분석

① 대상자들의 혈액 내 생화학적 지표 분석을 실시함(Table 27)

② 혈중 TG의 경우 정상범위 내에서 약 13 mg//dL 감소하는 경향을 보였으나, 통계적인 유의성은 나타나지 않음

③ 혈액 내 생화학적 지표들 또한 정상범위를 유지하였으며, 중재기간 중 특이한 문제점은 발견되지 않음

Table 27. Effect of pine needle supplementation on plasma biochemical parameters

	Group	Week		
		0	6	12
FBS (mg/dL) <sup>1)</sup>	Pine needle	108.4±1.8 <sup>2)</sup>	101.6±2.9	111.8±2.6
	Placebo	107.1±2.1	101.6±1.8	104.4±2.5
TC (mg/dL)	Pine needle	180.9±8.3	184.0±8.5	176.5±8.6
	Placebo	169.5±6.1	171.6±6.8	166.4±7.2
TG (mg/dL)	Pine needle	137.2±25.1	143.0±19.7	124.1±19.3
	Placebo	98.1±9.6	98.3±9.4	98.8±8.8
LDL-C (mg/dL)	Pine needle	106.1±6.6	107.4±6.1	104.4±7.3
	Placebo	101.9±6.2	105.3±6.8	99.4±7.0
HDL-C (mg/dL)	Pine needle	47.4±2.2	48.0±2.1	47.3±1.8

	Placebo	47.9±2.5	46.7±2.5	47.1±1.8
AST (U/L)	Pine needle	24.3±5.3	28.4±7.4	27.4±7.1
	Placebo	18.7±1.3	21.5±1.7	19.6±1.3
ALT (U/L)	Pine needle	32.4±12.4	43.4±18.1	39.2±15.7
	Placebo	17.7±1.6	22.6±2.7	19.1±2.1
$\gamma$ -GTP (U/L)	Pine needle	29.5±6.9	39.6±10.8	34.3±8.4*
	Placebo	18.3±2.2	17.8±1.9	17.5±1.4
Eosinophil count(/uL)	Pine needle	106.1±6.6	178.4±20.1	183.0±45.4
	Placebo	101.9±6.2	171.9±24.9	168.0±21.0
Total protein (g/dL)	Pine needle	7.7±0.1	7.5±0.1	7.1±0.3
	Placebo	7.4±0.1	7.5±0.1	7.4±0.1
Albumin(g/dL)	Pine needle	4.9±0.1	4.8±0.1	4.8±0.1
	Placebo	4.8±0.1	4.8±0.1	4.8±0.1
Total Bilirubin(mg/dL)	Pine needle	0.5±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1
	Placebo	0.7±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1
LDH(U/L)	Pine needle	192.6±7.6	210.7±10.9	207.0±11.4
	Placebo	191.9±5.1	231.4±23.4	237.6±32.4
CPK(U/L)	Pine needle	117.8±13.6	115.5±10.1	196.6±42.4
	Placebo	119.2±18.0	197.3±62.9	162.4±38.0
BUN(mg/dL)	Pine needle	12.6±0.6	14.5±0.8	12.6±0.7
	Placebo	12.4±0.6	12.0±0.8	12.3±0.5
Creatinine(mg/dL)	Pine needle	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0
	Placebo	0.7±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0
Uric acid(mg/dL)	Pine needle	6.6±0.5	6.6±0.5	6.4±0.6
	Placebo	5.4±0.3	5.1±0.3	5.3±0.3
Sodium(mEq/L)	Pine needle	139.9±0.7	139.3±0.7	140.3±0.4
	Placebo	140.6±0.6	138.1±1.1	139.9±1.0
Potassium(mEq/L)	Pine needle	5.6±0.1	5.6±0.4	5.1±0.1
	Placebo	5.5±0.2	6.0±0.5	5.1±0.3
Chloride(mEq/L)	Pine needle	99.7±0.6	99.7±0.4	99.7±0.5
	Placebo	100.5±0.6	100.1±0.6	100.3±0.4
Phosphorus(mg/dL)	Pine needle	4.3±0.1	4.2±0.2	4.0±0.1
	Placebo	4.1±0.1	4.1±0.1	4.0±0.1
Calcium(mg/dL)	Pine needle	9.6±0.1	9.5±0.1	9.5±0.1
	Placebo	9.4±0.1	9.3±0.1	9.4±0.1
Hb(g/dL)	Pine needle	15.1±0.3	15.2±0.4	14.7±0.3
	Placebo	14.7±0.4	14.5±0.4	14.3±0.4
Hct(%)	Pine needle	46.0±1.0	47.0±1.0	45.8±1.0
	Placebo	45.4±0.9	45.4±1.0	44.5±1.0
RBC(/uL)	Pine needle	5.1±0.1	5.2±0.1	5.1±0.1
	Placebo	5.0±0.1	5.0±0.1	4.9±0.1

WBC(/ $\mu$ L)	Pine needle	7.6 $\pm$ 0.4	7.7 $\pm$ 0.5	7.3 $\pm$ 0.3
	Placebo	6.7 $\pm$ 0.3	6.7 $\pm$ 0.4	6.6 $\pm$ 0.4
Platelet(/ $\mu$ L)	Pine needle	316.3 $\pm$ 14.4	312.4 $\pm$ 14.1	302.1 $\pm$ 13.2
	Placebo	306.4 $\pm$ 15.6	293.1 $\pm$ 15.9	307.7 $\pm$ 15.9
Segmented neutrophils(%)	Pine needle	52.9 $\pm$ 2.2	47.6 $\pm$ 1.8	49.2 $\pm$ 2.0
	Placebo	51.0 $\pm$ 1.6	49.1 $\pm$ 2.6	50.3 $\pm$ 1.7
Lymphocytes(%)	Pine needle	36.4 $\pm$ 2.1	40.5 $\pm$ 1.7	39.0 $\pm$ 2.0
	Placebo	38.1 $\pm$ 1.6	40.9 $\pm$ 3.0	38.9 $\pm$ 1.7
Monocytes(%)	Pine needle	7.7 $\pm$ 0.4	8.7 $\pm$ 0.5	8.4 $\pm$ 0.5
	Placebo	7.4 $\pm$ 0.5	8.0 $\pm$ 0.5	7.5 $\pm$ 0.4
Eosinophils(%)	Pine needle	2.4 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.3	2.7 $\pm$ 0.6
	Placebo	2.8 $\pm$ 0.4	2.4 $\pm$ 0.4	2.6 $\pm$ 0.3
Basophils(%)	Pine needle	0.7 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1
	Placebo	0.8 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.4	0.9 $\pm$ 0.1
MCV(fL)	Pine needle	89.9 $\pm$ 0.8	89.8 $\pm$ 0.9	90.2 $\pm$ 0.8
	Placebo	90.6 $\pm$ 0.7	90.4 $\pm$ 0.8	90.5 $\pm$ 0.7
MCH(pg)	Pine needle	29.5 $\pm$ 0.3	29.2 $\pm$ 0.3	29.1 $\pm$ 0.3
	Placebo	29.3 $\pm$ 0.3	28.9 $\pm$ 0.4	29.0 $\pm$ 0.3
MCHC(g/dL)	Pine needle	32.8 $\pm$ 0.2	32.5 $\pm$ 0.2	32.2 $\pm$ 0.2
	Placebo	32.4 $\pm$ 0.2	31.9 $\pm$ 0.2	32.1 $\pm$ 0.2
RDW(%)	Pine needle	12.2 $\pm$ 0.1	12.3 $\pm$ 1.1	12.4 $\pm$ 0.1
	Placebo	12.5 $\pm$ 0.2	12.7 $\pm$ 0.3	12.8 $\pm$ 0.3
MPV(fL)	Pine needle	10.9 $\pm$ 0.2	10.9 $\pm$ 0.2	10.9 $\pm$ 0.2
	Placebo	11.1 $\pm$ 0.2	11.2 $\pm$ 0.3	11.0 $\pm$ 0.2
PDW(fL)	Pine needle	13.0 $\pm$ 0.3	13.3 $\pm$ 0.3	13.2 $\pm$ 0.3
	Placebo	13.6 $\pm$ 0.5	13.8 $\pm$ 0.6	13.2 $\pm$ 0.5

1)FBS; fasting blood sugar, TC; total cholesterol, TG; triglyceride, LDL-C; low density lipoprotein cholesterol, HDL-C; high density lipoprotein cholesterol, AST; aspartate aminotransferase, ALT; alanine aminotransferase,  $\gamma$ -GTP;  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase, LDH; lactate dehydrogenase, CPK; creatine phosphokinase, BUN; blood urea nitrogen, Hb; hemoglobin, Hct; hematocrit, RBC; red blood cell, WBC; white blood cell, MCV; mean corpuscular volume, MCH; mean corpuscular hemoglobin, MCHC; mean corpuscular hemoglobin concentration, RDW; red blood cell distribution width, MPV; mean platelet volume, PDW; platelet Distribution Width

2)Mean  $\pm$  S.E

(바) 혈장 비만대사관련 지표

- ① 대표적인 비만대사와 관련된 지표를 측정한 결과(Table 28), 술앞군에서 혈장 leptin 함량이 섭취 0주보다 섭취 12주에 유의적으로 감소하였으나, 플라시보군에서는 섭취전 후의 변화가 없음
- ② 혈장 Adiponectin, IL-6, TNF- $\alpha$  및 hs-CRP 함량은 모든 그룹에서 섭취전후의 유

의적인 차이가 나타나지 않음

Table 28. Effect of pine needle supplementation on obesity biomarkers

	Group	Week		
		0	6	12
Adiponectin(ng/mL)	Pine needle	9.60±1.37 <sup>2)ns3)</sup>	9.86±1.74	10.76±1.18
	Placebo	13.21±2.35 <sup>ns</sup>	13.70±2.41	12.51±1.87
Leptin(ng/mL)	Pine needle	0.17±0.04 <sup>ns</sup>	0.16±0.04	0.10±0.03*
	Placebo	0.15±0.04 <sup>ns</sup>	0.16±0.04	0.18±0.04
IL-6(ng/mL) <sup>1)</sup>	Pine needle	0.04±0.02 <sup>ns</sup>	0.03±0.02	0.02±0.01
	Placebo	0.05±0.03 <sup>ns</sup>	0.01±0.00	0.03±0.01
TNF-α(ng/mL)	Pine needle	5.2±0.2 <sup>ns</sup>	5.2±0.3	5.4±0.3
	Placebo	5.6±0.3 <sup>ns</sup>	5.5±0.2	5.3±0.2
hs-CRP(ng/mL)	Pine needle	4950.1±875.7 <sup>ns</sup>	4593.5±722.5	4393.6±776.2
	Placebo	3930.1±861.2 <sup>ns</sup>	2612.8±595.6	2298.7±484.1

1)IL-6; interleukin-6, TNF-α; tumor necrosis factor-α, hs-CRP; high sensitive-C reaction protein

2)Mean ± S.E

3)ns: not significantly different at  $p<0.05$  after Student' s  $t$ -test between group

\*Significant difference between periods (0w vs. 6w or 0w vs. 12w) by paired  $t$ -test  $p<0.05$

(사) 혈장 혈압관련 지표

- ① 솔잎군의 체지방 관련지표에서는 허리, 엉덩이 둘레, leptin을 제외한 지표에서는 유의적인 차이를 확인할 수 없었던 반면, 수축기 혈압에서 유의적으로 감소하는 결과를 확인하여 혈장 내 혈압관련 지표를 측정함
- ② 혈압관련 지표를 측정한 결과,(Table 29) 혈액응고 지표 중 하나인 plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1)은 솔잎 섭취 0주보다 6주( $5.8±0.3$  ng/mL)와 12주( $5.4±0.3$ ng/mL)에 유의적으로 감소하였고, 혈관수축을 유발하는 endothelin-1(ET-1)은 솔잎 섭취 0주보다 12주( $2.5±0.5$  pg/mL)에 유의적으로 감소함
- ③ 플라시보군에서는 PAI-1과 ET-1 모두 섭취에 따른 유의적인 변화를 확인할 수 없음
- ④ Renin activity, ACE, aldosterone 및 angiotensin 1에서는 솔잎군과 플라시보군 모두 유의적인 차이를 확인할 수 없었던 점을 보아 솔잎의 섭취는 RAAS 시스템을 이용한 혈압 조절이 아닌 PAI-1의 농도를 감소시킴으로써 높은 혈압을 감소에 긍정적인 영향을 미치는 것을 사료됨

Table 29. Effect of pine needle supplementation on blood pressure biomarkers

Group	Week
-------	------

		0	6	12
PAI-1(ng/mL) <sup>1)</sup>	Pine needle	6.1±0.3 <sup>2)ns3)</sup>	5.8±0.3*	5.4±0.3*
	Placebo	5.3±0.2 <sup>ns</sup>	5.3±0.2	5.4±0.5
ET-1(pg/mL)	Pine needle	3.0±0.6 <sup>ns</sup>	2.7±0.5	2.5±0.5*
	Placebo	2.2±0.2 <sup>ns</sup>	2.2±0.2	2.3±0.2
Renin activity(pg/mL)	Pine needle	381.3±45.2 <sup>ns</sup>	406.4±36.1	359.4±48.2
	Placebo	224.3±23.0 <sup>ns</sup>	230.4±15.2	209.5±15.5
ACE	Pine needle	62.2±4.6 <sup>ns</sup>	62.3±4.6	63.2±4.0
	Placebo	63.7±4.2 <sup>ns</sup>	58.3±5.6	61.3±4.9
Aldosterone	Pine needle	260.5±28.4 <sup>ns</sup>	308.7±37.6	284.2±35.6
	Placebo	268.6±32.3 <sup>ns</sup>	311.2±40.1	277.4±35.6
Angiotensin 1	Pine needle	8103.6±759.1 <sup>ns</sup>	9025.0±507.0	8691.4±662.3
	Placebo	2416.4±807.9 <sup>ns</sup>	3725.0±1124.0	2751.0±908.4

1)PAI-1; plasminogen activator inhibitor-1, ET-1; endothelin-1, ACE; angiotensin converting enzyme

2)Mean ± S.E

3)ns: not significantly different at  $p < 0.05$  after Student' s  $t$ -test between group

\*Significant difference between periods (0w vs. 6w or 0w vs. 12w) by paired  $t$ -test  $p < 0.05$

(아) 항산화관련 지표

① 비타민C 함량, 총 항산화능 및 혈장 ORAC 캡슐 섭취 전후의 혈액 내 비타민C 함량, 총 항산화능 및 혈장 ORAC 값을 비교해보았을 때 (Table 30), 솔잎군과 플라시보군 모두 섭취 전후 유의적인 차이를 확인할 수 없음

Table 30. Effect of pine needle supplementation on plasma vitamin C, total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) and oxygen radical absorbance capacity (ORAC)

	Group	Week		
		0	6	12
Vitamin C (mmol/L)	Pine needle	0.19±0.00 <sup>2)ns3)</sup>	0.19±0.01	0.19±0.00
	Placebo	0.14±0.00 <sup>ns</sup>	0.15±0.00	0.15±0.00
TRAP (mM) <sup>1)</sup>	Pine needle	1.15±0.05 <sup>ns</sup>	0.19±0.05	1.18±0.05
	Placebo	1.25±0.02 <sup>ns</sup>	1.30±0.02	1.28±0.02
ORAC (μM TE)	Pine needle	70.3±8.5 <sup>ns</sup>	79.2±13.6	70.7±8.7
	Placebo	81.7±8.1 <sup>ns</sup>	87.9±9.4	78.9±7.9

1)TRAP; total radical-trapping antioxidant potential, ORAC; oxygen Radical Absorbance Capacity

2)Mean ± S.E

3)ns: not significantly different at  $p < 0.05$  after Student' s  $t$ -test between group

② 적혈구 항산화 효소 활성

- 캡슐 섭취 전후의 적혈구 항산화 효소 활성을 비교해보았을 때(Table 31), 솔잎군과 플라시보군 모두 섭취 전후 유의적인 차이를 확인할 수 없음

Table 31. Effect of pine needle supplementation on erythrocyte antioxidant enzyme

	Group	Week		
		0	6	12
CAT(K/g Hb) <sup>1)</sup>	Pine needle	139.7±10.7 <sup>2)ns3)</sup>	129.8±8.6	132.6±6.4
	Placebo	146.5±9.5 <sup>ns</sup>	139.1±7.7	140.1±10.6
SOD(IU/g Hb)	Pine needle	1864.5±103.4 <sup>ns</sup>	1862.3±93.1	1923.4±75.6
	Placebo	1465.4±65.2 <sup>ns</sup>	1445.6±75.2	1402.1±71.1
GSH-Px(IU/g Hb)	Pine needle	26.1±1.6 <sup>ns</sup>	27.0±2.4	26.8±2.0
	Placebo	31.9±1.4 <sup>ns</sup>	35.1±1.6	34.2±1.9

1)CAT; catalase, SOD; superoxide dismutase, GPx; glutathione-peroxidase

2)Mean ± S.E

3)ns: not significantly different at  $p < 0.05$  after Student' s  $t$ -test between group

③ 혈중 지질과산화물

- 캡슐 섭취 전후의 혈중 지질과산화물을 비교해보았을 때(Table 32), 솔잎군과 플라시보군 모두 섭취 전후 유의적인 차이를 확인할 수 없음

Table 32. Effect of pine needle supplementation on plasma lipid peroxidation

	Group	Week		
		0	6	12
CD( $\mu$ M) <sup>1)</sup>	Pine needle	5.9±0.5 <sup>2)ns3)</sup>	5.7±0.4	5.6±0.6
	Placebo	4.8±0.4 <sup>ns</sup>	4.8±0.6	4.9±0.5
TBARS( $\mu$ M)	Pine needle	4.1±0.6 <sup>ns</sup>	4.0±0.5	4.1±0.2
	Placebo	3.9±0.5 <sup>ns</sup>	3.9±0.6	3.9±0.5

1)CD; conjugated diene, TBARS; thiobarbituric acid reactive substances

2)Mean ± S.E

3)ns: not significantly different at  $p < 0.05$  after Student' s  $t$ -test between group

④ 항유전독성(백혈구 DNA 손상도)

- 캡슐 섭취 전후 백혈구의 DNA 손상도를 측정한 결과(Table 33), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 산화적 스트레스를 유도하였을 때, 플라시보군에서는 유의적인 차이를 보이지 않음
- 솔잎군에서는 섭취 12주 후 Head DNA의 증가와 Tail DNA의 감소로 DNA 손상도

가 유의적으로 회복되는 것을 확인할 수 있었다. Tail Extentmoment와 Tail Length는 솔잎군과 플라시보군 모두 유의적인 차이가 없음

Table 33. Effect of pine needle supplementation on DNA damage of leukocyte

	Group	Week		
		0	6	12
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> treated DNA damage				
Head DNA(%)	Pine needle	50.2±3.0 <sup>2a3)</sup>	53.3±3.1 <sup>ab</sup>	60.2±2.9 <sup>b</sup>
	Placebo	56.7±3.1 <sup>ns</sup>	58.1±3.3	53.8±2.7
Tail DNA(%)	Pine needle	49.8±3.0 <sup>b</sup>	46.7±3.1 <sup>ab</sup>	39.8±2.9 <sup>a</sup>
	Placebo	43.3±3.1 <sup>ns</sup>	41.9±3.3	46.2±2.7
Tail Extentmoment(μm)	Pine needle	345.0±27.1 <sup>ns</sup>	331.5±26.1	315.6±24.6
	Placebo	314.6±24.4 <sup>ns</sup>	316.4±28.1	324.6±21.4
Tail Length	Pine needle	556.1±32.4 <sup>ns</sup>	561.4±31.6	532.6±36.2
	Placebo	563.8±31.6 <sup>ns</sup>	543.5±36.8	532.4±31.4

1) Mean ± S.E

2) For all the values of each sample, different superscripts mean significant differences ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

⑤ 항산화 유전자 발현 측정

- SOD1, SOD2 GPx 유전자 발현에 대한 결과는 Table 34에 제시함
- SOD1의 발현은 솔잎군에서 섭취 0주와 비교하여 섭취 6주 후 증가하는 경향을 보였으며, 섭취 12주 후에 유의적으로 증가함
- 플라시보군에서는 유의적인 차이를 보이지 않음
- GPx의 경우 솔잎군에서 섭취 6주 후 발현 정도가 감소하는 경향을 보였으나, 섭취 12주 후 6주보다 유의적으로 증가하여, 0주와 비교하여도 GPx의 발현 정도가 증가하는 경향을 보임

Table 34. Effect of pine needle supplementation on SOD1, SOD2, GPx gene expression

	Group	Week		
		0	6	12
SOD1 <sup>1)</sup>	Pine needle	1.00±0.12 <sup>2)a3)</sup>	1.51±0.27 <sup>ab</sup>	2.46±0.55 <sup>c*</sup>
	Placebo	1.00±0.24 <sup>ns4)</sup>	1.24±0.23	1.35±0.38
SOD2	Pine needle	1.00±0.32 <sup>ns</sup>	0.84±0.14	1.46±0.49
	Placebo	1.00±0.31 <sup>ns</sup>	1.40±0.36	0.70±0.09
GPx	Pine needle	1.00±0.20 <sup>ab</sup>	0.44±0.14 <sup>a</sup>	1.21±0.31 <sup>b</sup>
	Placebo	1.00±0.14 <sup>ns</sup>	0.86±0.23	0.82±0.12

1)SOD; superoxide dismutase, GPx; glutathione-peroxidase

2)Mean  $\pm$  S.E

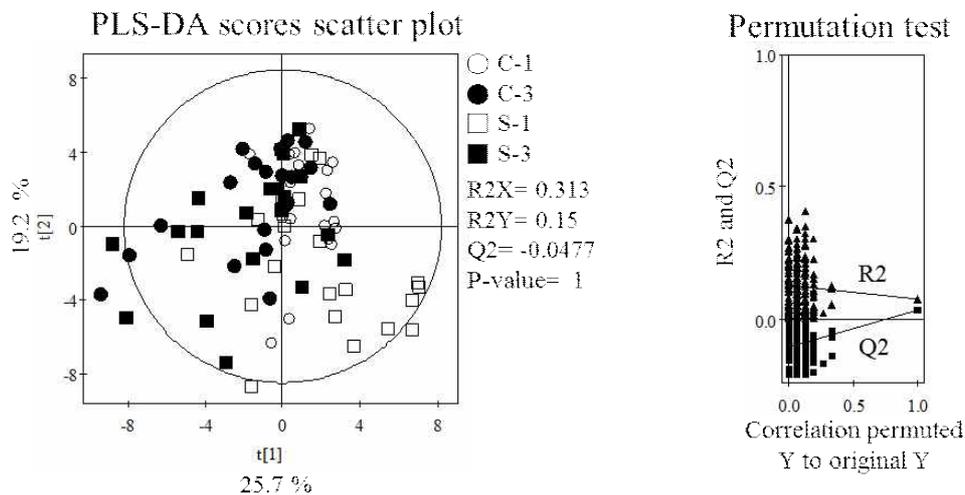
3)For all the values of each sample, different superscripts mean significant differences ( $p < 0.05$ ) by Duncan's multiple range test.

\*Significant difference between periods (0w vs. 6w or 0w vs. 12w) by paired  $t$ -test  $p < 0.05$

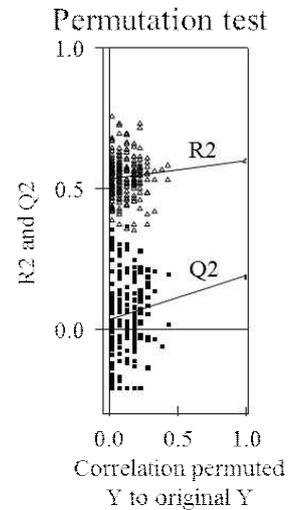
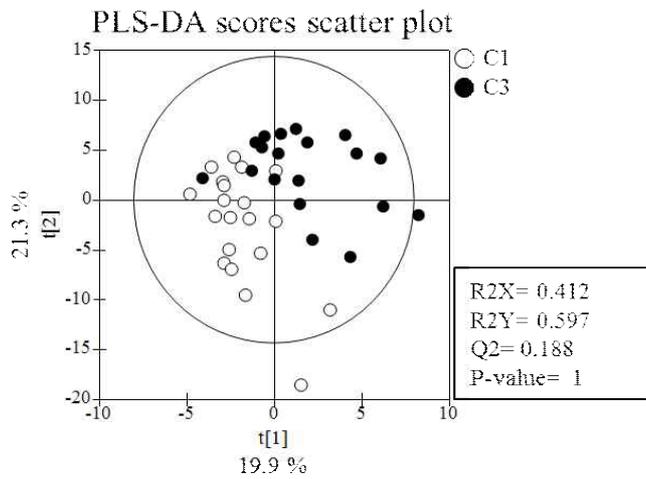
(자) LC-MS/MS 활용 솔잎착즙분말의 생체이용률 분석

- ① LC-MS/MS를 이용하여 캡슐 섭취 전후의 생체이용률을 분석함(그림 54와 55, Table 35)
- ② PLS-DA scores scatter plot을 통한 분석결과, 솔잎군과 플라시보군 모두 섭취 전후에 따른 유의적인 변화는 없음(그림 54 A).
- ③ 플라시보군의 섭취 전후 비교(그림 54 B), 솔잎군의 섭취 전후 비교(그림 54 C), 0주 플라시보군과 솔잎군의 비교(그림 54 D), 12주 후 플라시보군과 솔잎군의 비교(그림 54 E)에서도 유의적인 차이를 확인할 수 없음
- ④ 솔잎군과 플라시보군의 0주와 12주의 대사체(Phenylalanylphenylalanine, 2-octenoylcarnitine, Traumatic Acid, O-octanoyl-L-carnitine, monomethyl succinate, L-Asparaginyl-L-isoleucyl-L-prolyl-L-prolyl-L-leucine, Behenamide)를 분석한 결과(Table 35), 솔잎착즙분말 섭취에 따른 대사체의 유의적인 변화를 확인함
- ⑤ 솔잎군에서는 2-octenoylcarnitine, Traumatic Acid, O-octanoyl-L-carnitine, monomethyl succinate, L-Asparaginyl-L-isoleucyl-L-prolyl-L-prolyl-L-leucine이 섭취 0주보다 섭취 12주 후 유의적으로 증가하였으나 플라시보군에서는 유의적인 차이가 나타나지 않음
- ⑥ 현재 유의적인 차이를 보인 대사체 물질의 대사기전 등을 확인하기에는 어려움이 많아 추후 연구가 진행되어야 할 것임

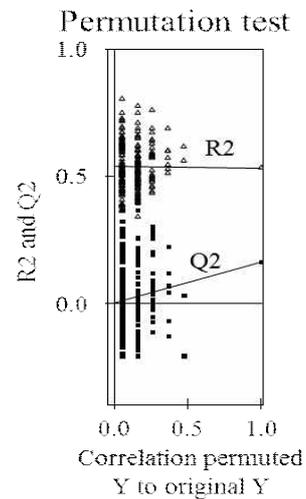
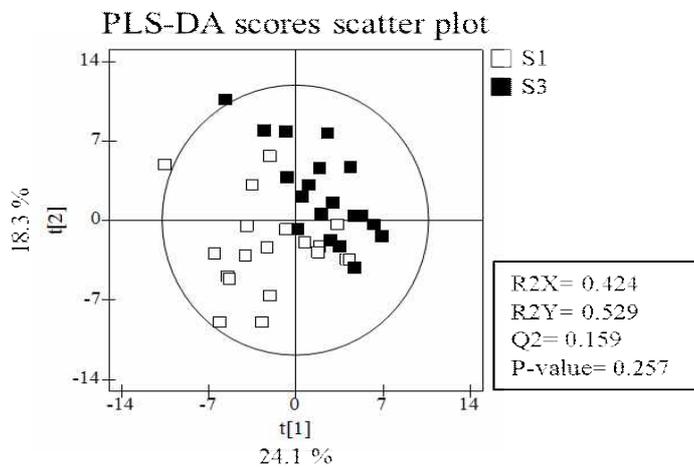
A



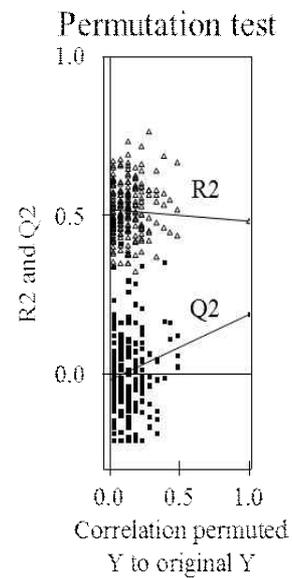
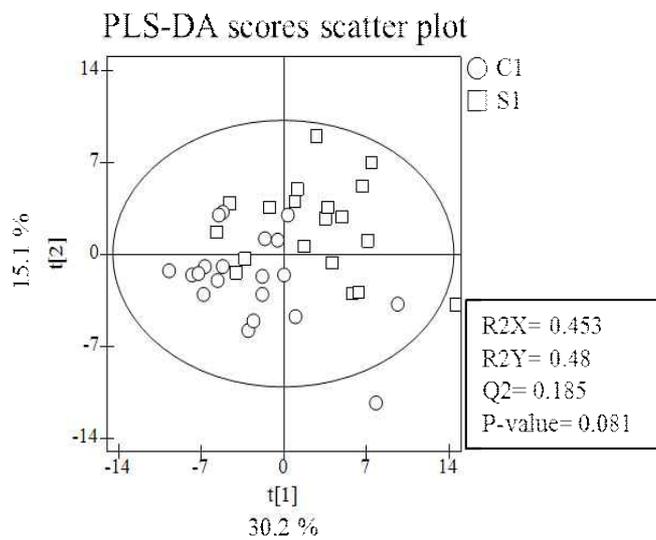
B



C



D



E

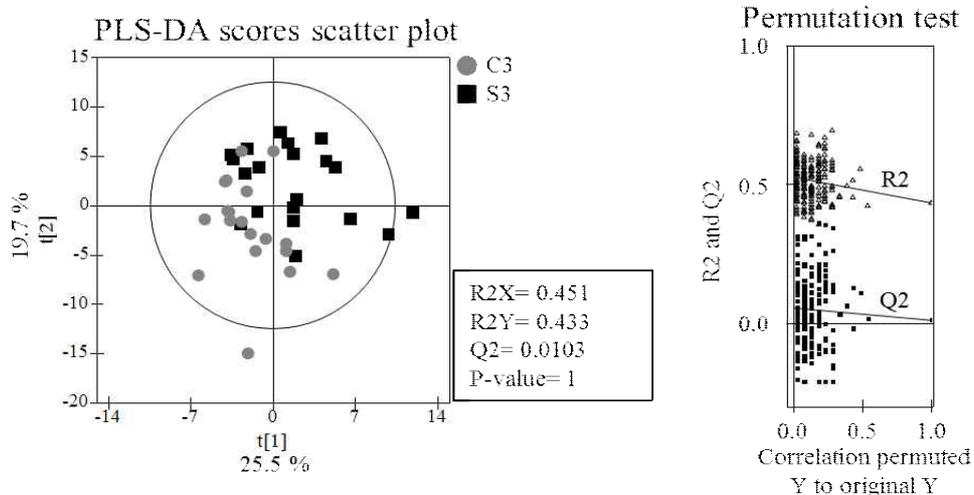
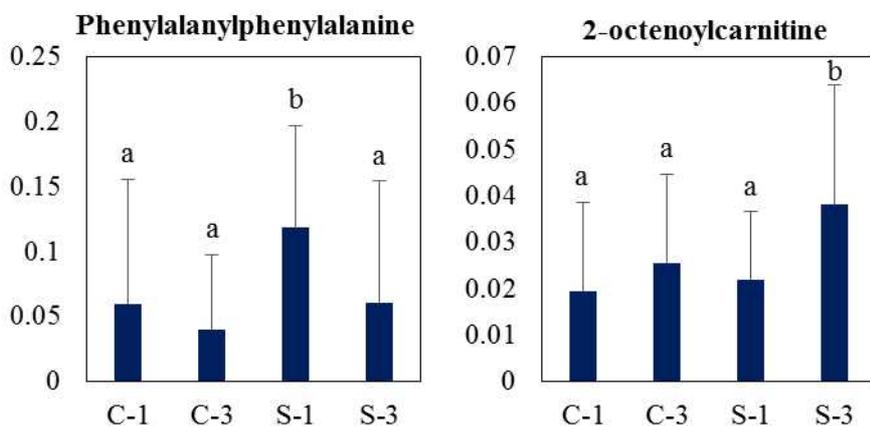


그림 54. PLS-DA scores scatter plot. C1; placebo before, C3; placebo after, S1; pine needle before, S3; pine needle after.

Table 35. Identification of major metabolites contributing the separation among sample groups

No.	RT (min)	Compound	Exact mass (M+H)	MS Fragments	VIP	p-value
1	3.44	Phenylalanylphenylalanine	313.1562	510	1.86	0.023
2	3.86	2-octenoylcarnitine	286.2015	103	1.35	0.021
3	4.14	Traumatic Acid	229.1442	101, 185	1.84	0.001
4	4.17	O-octanoyl-L-carnitine	288.2167	229	0.87	0.055
5	4.71	monomenthyl succinate	257.1757	213, 221, 239	1.82	0.002
6	6.40	L-Asparaginyll-L-isoleucyl-L-prolyl-L-prolyl-L-leucine	553.3342	86, 115	1.75	0.006
7	9.24	Behenamamide	340.3595	88	0.95	0.047



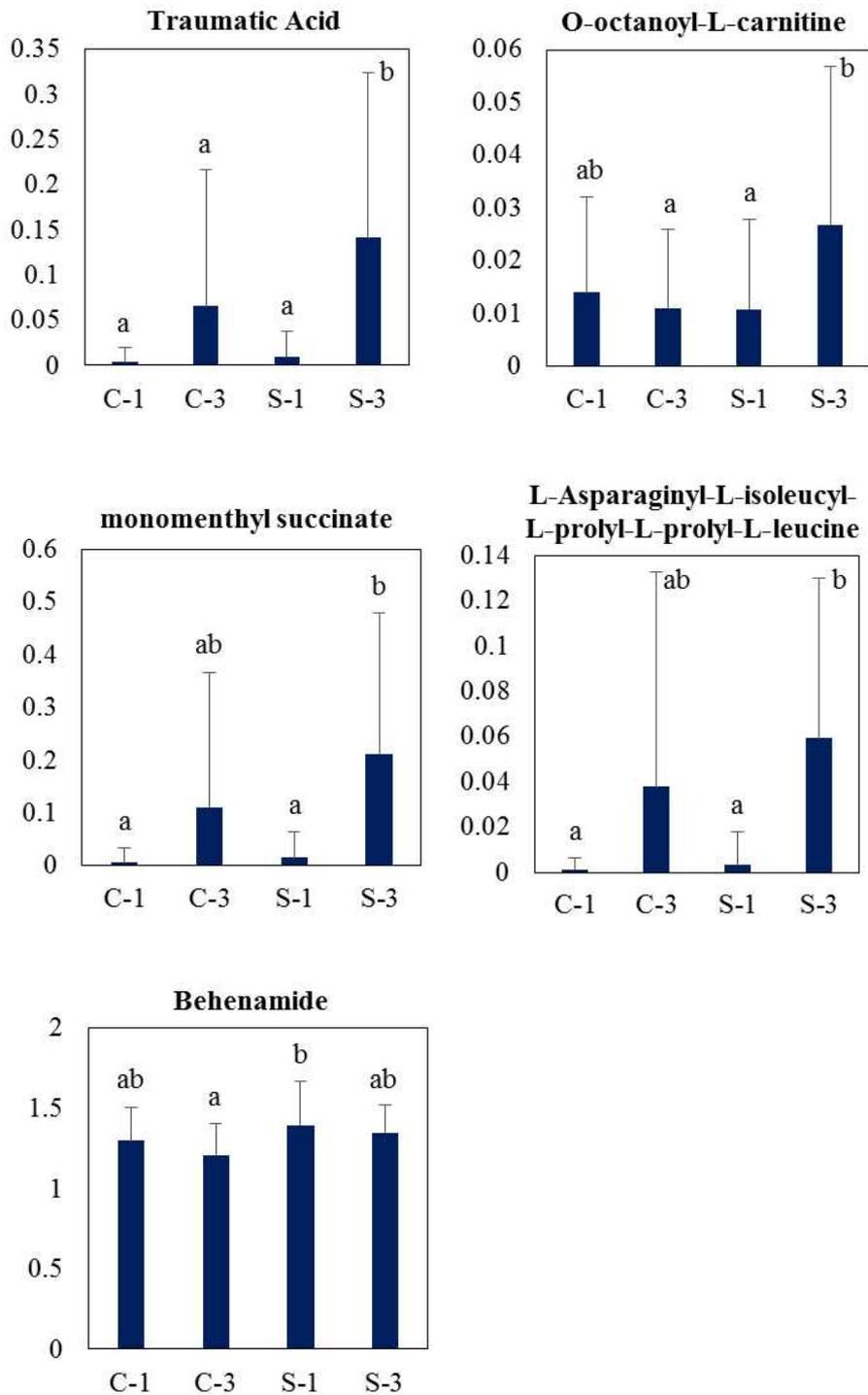


그림 55. Relative abundance

(차) 결론 및 제언

- ① 술잎착즙분말 섭취에 의해 체지방분석 지표인 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리-엉덩이둘레비가 감소하였으며, 비만대사 관련 지표에서 혈장 leptin의 수준이 유의적으로 감소함
- ② 술잎착즙분말의 섭취로 수축기혈압과 이완기혈압이 유의적으로 감소하였으며, 혈압 관련 지표 중 혈장 PAI-1과 ET-1에서 술잎착즙분말 섭취 시 유의적으로 감소함
- ③ 백혈구의 DNA 손상 보호 효과를 나타내었고, 항산화 유전자인 SOD1에서 술잎착즙분말

섭취 후 유전자 발현 정도가 유의적으로 증가함

- ④ 이상의 결과를 바탕으로 솔잎착즙분말의 섭취는 허리둘레, 엉덩이둘레 감소 효과를 보였으며, PAI-1과 ET-1의 감소로 수축기혈압과 이완기혈압 감소에 영향을 준 것으로 보임. 또한 백혈구의 DNA 손상 보호 효과 및 SOD1 유전자 발현 증가 효과를 나타냄. 솔잎착즙분말은 체지방 개선뿐만 아니라 높은 혈압을 감소시킬 수 있는 기능성 식품의 소재로써 우수한 효능을 가지는 것으로 사료됨

## 제 7 절. 솔잎착즙분말의 안전성 평가 자료 확보 및 요약서 작성

### 1. 식품의약품안전처 제출자료 총괄 요약서 작성

항 목	주요 내용	
1. 원료명	솔잎착즙분말	
2. 원재료	소나무 잎 (학명: <i>Pinus densiflora</i> , 사용부위 : 잎)	
3.기능 (지표)성분	지표 성분 : Shikimic acid	
4. 제조 공정	소나무 잎 채취 → 세척 → 착즙 → 동결건조 → 솔잎착즙분말 (신청원료)	
5. 규격 및 시험방법	1) 색상 : 진한 녹색의 짙은 맛이 나는 분말 2) Shikimic acid (지표성분) : 63.95 (mg/g) 3) 납(mg/kg) : 3 이하 4) 총비소(mg/kg) : 1 이하 5) 카드뮴(mg/kg) : 1 이하 6) 총수은(mg/kg) : 0.5 이하 7) 대장균군 : 음성	
	기능(지표) 성분 시험법	자사시험방법 (HPLC UV 210nm C18 column)
	규격 외 (잔류농약)	「수입식품등 검사에 관한 규정」에 신청원료에 대한 농약의 잔류허용기준은 없으며, 이에 따라 5종 잔류농약(엔드린, 디엘드린, 알드린, BHC, DDT)외 총 320 성분에 대하여 국내 식품위생검사기관 시험결과 '불검출' 임을 확인함
6. 안전성	의사결정도	섭취경험이 있는 <i>Pinus densiflora</i> (학명)의 잎을 착즙 후 동결 한 것(특성 성분이 분리.

	정제되지 않음)으로, 알려진 부작용이 없으며, 섭취량이 일상 섭취량보다 증가하지 않았으므로 의사결정도 '나'에 해당
섭취 근거	<p>&lt;인정현황&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 솔잎은 식품의 기준 및 규격(2016-43호)에 식물성 원료(1043)로 분류되어 있음</li> <li>- 식품의약품안전처와 농촌진흥청 원료DB에 식용이 가능한 원료로 분류되어 있음</li> <li>- 유사원료인 솔잎증류농축액(인정번호 제2007-8호, 제2012-30호)과 프랑스해안 송겹질추출물(인정번호 제2006-1호) 이 건강기능식품 기능성 원료로 인정됨</li> </ul> </li> <li>○ 미국 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미국 FDA에서 식물성 원료로 분류되어 있음</li> </ul> </li> </ul> <p>&lt;사용현황&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내 : 솔잎차증액, 솔잎발효액, 환 등 제품이 판매되고 있음</li> <li>○ 미국, 일본, 중국 등 : 국내 솔잎 제품이 미국에서 판매되고 있음</li> </ul>
안전성 정보	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 부작용에 대한보고는 없음</li> <li>○ 섭취 시 주의사항 권고 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 알레르기 환자(피부 및 기관지 포함) 또는 Pinus 계통 식물에 대한 알레르기</li> <li>- 임신 또는 모유 수유 중인 여성</li> <li>- 출혈이 있는 약제</li> <li>- 혈압을 낮추는 약 또는 지질 수준을 낮추는 약제</li> <li>- 지방 또는 콜레스테롤 수치가 높은 환자</li> <li>- 당뇨병 또는 혈당이 낮은 사람</li> <li>- 혈당에 영향을 미치는 약물, 허브 또는 보충제를 복용하는 사람</li> <li>- 면역, 심장, 간, 위장 장애가 있는 환자</li> </ul> </li> </ul>
섭취량 평가	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 신청원료의 섭취량 : 신청원료로서 3g/일:</li> <li>○ 유사원료(기능성원료, 제2007-8호와 제2012-30호) 1일섭취량 : 1350mg/일</li> <li>○ 유사원료(기능성원료, 제2006-1호) 1일섭취량 : 50~300mg/일</li> <li>○ 한국인의 솔잎차증분말 섭취량 자료는 동의보감 자료를 근거로 섭취량을 평가함(내경편) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 솔잎차증분말의 <b>제안 섭취량(3g)</b>은 동의보감에서 제시하고 있는 11.25g의 3배를 상회하지 않음</li> </ul> </li> </ul>
인체적용시험	<ul style="list-style-type: none"> <li>◦ 20-60세 남녀(남자 11명, 여자 4명)에게 신청원료(솔잎차증분말) 3.15 g/일을 8주간 섭취시킨 결과, 안전성 지표(체중, BMI, 혈당, TG, TC, HDL-C, LDL-C, BUN, AST, ALT)에서 모두 정상 범위였으며, 신청원료의 이상반응 보고는 없었음</li> </ul>
독성 시험	- 해당사항 없음
기타 사항	- 해당사항 없음
섭취 시 주의사항	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 알레르기 환자(피부 및 기관지 포함) 또는 Pinus 계통 식물에 대한 알레르기</li> <li>○ 임신 또는 모유 수유 중인 여성</li> <li>○ 출혈이 있는 약제</li> <li>○ 혈압을 낮추는 약 또는 지질 수준을 낮추는 약제</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 지방 또는 콜레스테롤 수치가 높은 환자</li> <li>○ 당뇨병 또는 혈당이 낮은 사람</li> <li>○ 혈당에 영향을 미치는 약물, 허브 또는 보충</li> </ul>
<b>7. 기능성</b>	신청 기능성	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 체지방 개선에 도움</li> <li>○ 높은 혈압감소에 도움</li> </ul>
	신청 일일섭취량	술잎착즙분말로서      3g/일
	시험관시험	<p>술잎착즙분말의 Pancreatic lipase 활성에 대한 분석을 용매별 농도별로 진행하여 억제효과를 확인하였으며, 3T3-L1 세포를 통한 지방분화 억제 효과를 확인하고 지방분화 관련 gene 발현 분석을 통한 aP2, PPAR-<math>\gamma</math>, C/EBP-a 발현 억제 기전을 확인하였음</p> <p>술잎에서 분리된 DAA와 4ETC는 ACE를 non-competitive 방법으로 억제시키며 HUVEC에서 Angiotensin type I과 II의 발현을 감소시켜 혈압상승을 억제시키며 eNOS 활성을 자극시키는 p-Akt의 발현을 증가시켜 혈압상승을 개선시키는 효과를 가지고 있음</p>
동물시험	<p>술잎착즙분말을 경구 투여한 실험군에서 모두 체중 및 비만에 관한 혈액분석 관련 마커가 유의적으로 감소하는 효과를 확인 함 (p &lt; 0.05)</p> <p>■ 고지방식으로 유도된 비만 쥐의 체중 변화 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 비만유도 마우스의 체중 변화(12주; 단위 g) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반식이 : 42.99 ± 1.41</li> <li>- 고지방식이 : 48.55 ± 3.54</li> <li>- 술잎착즙분말 300mg : 47.67 ± 3.3</li> <li>- 술잎착즙분말 500mg : 37.05 ± 2.39</li> </ul> </li> <li>○ 12주간 체중 변화 (단위 g) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반식이 : 12.14 ± 0.98</li> <li>- 고지방식이 : 18.94 ± 3.86</li> <li>- 술잎착즙분말 300mg : 17.66 ± 2.3</li> <li>- 술잎착즙분말 500mg : 7.66 ± 2.3</li> </ul> </li> <li>○ 백색지방 무게 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반식이 : 0.62 ± 0.05</li> <li>- 고지방식이 : 1.93 ± 0.36</li> <li>- 술잎착즙분말 300mg : 2.5 ± 0.17</li> <li>- 술잎착즙분말 500mg : 0.56 ± 0.13</li> </ul> </li> <li>○ 갈색지방 무게 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반식이 : 0.62 ± 0.05</li> <li>- 고지방식이 : 0.16 ± 0.01</li> <li>- 술잎착즙분말 300mg : 0.14 ± 0.02</li> <li>- 술잎착즙분말 500mg : 0.08 ± 0.01</li> </ul> </li> </ul> <p>■ 혈액분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Total lipid 분석(mg/dL) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반식이 : 491.25 ± 31.51</li> <li>- 고지방식이 : 748.67 ± 26.79</li> <li>- 술잎착즙분말 300mg : 676.80 ± 47.45</li> <li>- 술잎착즙분말 500mg : 536.75 ± 66.44</li> </ul> </li> <li>○ Total cholesterol 분석(mg/dL) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반식이 : 132.67 ± 9.29</li> </ul> </li> </ul>	

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 고지방식이 : 225.67 ± 4.19</li> <li>- 솔잎착즙분말 300mg : 240.6 ± 26.8</li> <li>- 솔잎착즙분말 500mg : 170.25 ± 27.77</li> </ul> <p>○ HDL 분석(mg/dL)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반식이 : 131.0 ± 9.63</li> <li>- 고지방식이 : 170.0 ± 29.13</li> <li>- 솔잎착즙분말 300mg : 219.5 ± 15.72</li> <li>- 솔잎착즙분말 500mg : 228.5 ± 24.26</li> </ul> <p>○ LDL 분석(mg/dL)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반식이 : 11.0 ± 1.22</li> <li>- 고지방식이 : 38.0 ± 5.89</li> <li>- 솔잎착즙분말 300mg : 38.67 ± 8.28</li> <li>- 솔잎착즙분말 500mg : 34.0 ± 4.39</li> </ul> <p>○ TG 분석(mg/dL)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반식이 : 88.25 ± 14.67</li> <li>- 고지방식이 : 111.0 ± 8.92</li> <li>- 솔잎착즙분말 300mg : 91.34 ± 12.28</li> <li>- 솔잎착즙분말 500mg : 67.6 ± 8.27</li> </ul> <p>○ FAA 분석(uEq/L)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반식이 : 640.67 ± 94.3</li> <li>- 고지방식이 : 687.5 ± 58.52</li> <li>- 솔잎착즙분말 300mg : 589.25 ± 80.41</li> <li>- 솔잎착즙분말 500mg : 447.8 ± 130.33</li> </ul> <p>○ ALT 분석(U/L)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반식이 : 41.5 ± 5.89</li> <li>- 고지방식이 : 45.0 ± 10.78</li> <li>- 솔잎착즙분말 300mg : 38.33 ± 3.86</li> <li>- 솔잎착즙분말 500mg : 28.75 ± 3.03</li> </ul> <p>○ AST 분석(U/L)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반식이 : 124.67 ± 11.15</li> <li>- 고지방식이 : 108.5 ± 5.85</li> <li>- 솔잎착즙분말 300mg : 94.8 ± 9.68</li> <li>- 솔잎착즙분말 500mg : 113.4 ± 11.93</li> </ul> <p>○ Total protein 분석 (g/dL)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 일반식이 : 5.16 ± 0.08</li> <li>- 고지방식이 : 5.14 ± 0.38</li> <li>- 솔잎착즙분말 300mg : 5.58 ± 0.27</li> <li>- 솔잎착즙분말 500mg : 5.63 ± 0.32</li> </ul> <p>솔잎착즙분말을 경구 투여한 실험군에서 모두 혈압이 유의적으로 감소하는 효과를 확인 함 (p &lt; 0.05)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 7주 후 혈압 <ul style="list-style-type: none"> <li>· 정상혈압 대조군 : 124.7 ± 8.77</li> <li>· SHR 대조군 : 192.7 ± 8.77 (p&lt;0.001)</li> <li>· SHR 양성 대조군 : 154.4 ± 8.67 (p&lt;0.01)</li> </ul> </li> </ul>
--	---

		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 솔잎착즙분말 100mg/kg : 168.6 ± 7.65 (p&lt;0.05)</li> <li>· 솔잎착즙분말 200mg/kg : 161.7 ± 1.61 (p&lt;0.05)</li> <li>· 솔잎착즙분말 300mg/kg : 153.1 ± 3.12 (p&lt;0.01)</li> </ul>
	인체적용시험	<p>○ 과체중(BMI 25-30 kg/m<sup>2</sup>) 대상자에 있는 반건강한 성인을 대상으로 진행하였음.</p> <p>○ 솔잎착즙분말 섭취에 의해 체지방분석 지표인 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리-엉덩이둘레비가 감소하였으며, 비만대사 관련 지표에서 혈장 leptin의 수준이 유의적으로 감소하였다.</p> <p>○ 솔잎착즙분말의 섭취로 수축기혈압과 이완기혈압이 유의적으로 감소하였으며, 혈압 관련 지표 중 혈장 PAI-1과 ET-1에서 솔잎착즙분말 섭취 시 유의적으로 감소하는 결과를 보였다.</p> <p>○ 백혈구의 DNA 손상 보호 효과를 나타내었고, 항산화 유전자인 SOD1에서 솔잎착즙분말 섭취 후 유전자 발현 정도가 유의적으로 증가하였다.</p> <p>○ 이상의 결과를 바탕으로 솔잎착즙분말의 섭취는 허리둘레, 엉덩이둘레 감소 효과를 보였으며, PAI-1과 ET-1의 감소로 수축기혈압과 이완기혈압 감소에 영향을 준 것으로 보인다. 또한 백혈구의 DNA 손상 보호 효과 및 SOD1 유전자 발현 증가 효과를 보였다.</p> <p>○ 솔잎착즙분말은 체지방 개선뿐만 아니라 높은 혈압을 감소시킬 수 있는 기능성 식품의 소재로써 우수한 효능을 가지는 것으로 사료된다.</p> <p>※인체적용시험기관 : 경남대학교생명윤리위원회('17) , 시험책임자 : 박은주</p> <p>○ 고혈압 전단계인 경계혈압(수축기 혈압 120~139 mmHg 또는 이완기 혈압 80~89 mmHg)에 있는 반건강한 20-60세 성인(n= 15), 3.15 g/일, 8주(RCT, DB)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 솔잎캡슐군의 수축기 혈압이 138.5 ± 3.9 mmHg에서 8주 후 133.0 ± 3.1 mmHg으로 유의적 감소(p&lt;0.05)하였으나, 위약캡슐군은 유의적 차이 없음</li> <li>- 혈행 관련 지표 aPTT는 솔잎캡슐군이 45.7 ± 2.5 sec에서 8주 후 40.8 ± 0.9 sec으로 유의적 감소(p&lt;0.05)하였으나, 위약캡슐군은 유의적 차이 없음</li> <li>- ADMA는 솔잎캡슐군이 0.6 ± 0.1 pg/mL에서 8주 후 0.4 ± 0.0 pg/mL으로 유의적 감소(p=0.001)하였으나, 위약캡슐군은 유의적 차이 없음</li> <li>- ET-1은 솔잎캡슐군이 6.6 ± 0.5 pg/mL에서 8주 후 4.6 ± 0.4 pg/mL으로 유의적 감소(p=0.000)하였으나, 위약캡슐군은 유의적 차이 없음</li> <li>- PAI-1은 솔잎캡슐군이 0.6 ± 0.0 pg/mL에서 8주 후 0.5 ± 0.0 pg/mL으로 유의적 감소(p&lt;0.05)하였으나, 위약캡슐군은 유의적 차이 없음</li> </ul> <p>※인체적용시험기관 : 경남대학교생명윤리위원회('14) , 시험책임자 : 박은주</p>
	기타 사항	- 해당사항 없음

## 2. 기원, 개발경위, 국내·외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

### 가. 기원

- 소나무는 소나무과에 속하며 한국, 일본과 중국 등이 원산지임. 동의보감과 본초강목에서 솔잎의 효능에 대해 명시하고 있음. 동의보감에서는 심혈관계 질환의 효능에 대해 적혀있으며, 본초강목에서는 항산화 효과에 대해 적혀있음. 최근 연구에서 솔잎은 혈전 분해, 중성지방 제거, 콜레스테롤 개선 등 다양한 생리활성을 갖고 있는 것으로 확인되어 생활습관병 예방을 위한 기능성 식품으로 활용성이 높을 것으로 판단 됨

<원재료의 기원에 관한 정보>

원재료명	솔잎착즙분말	비고(참고)
학명	<i>Pinus desiflora</i>	
원산지	한국	
사용부위	잎	

나. 개발경위

- 동의보감에서 솔잎은 피를 맑게 하는 효과가 있다고 명시하고 있음. 동의보감에서 말하고 있는 솔잎의 혈압감소에 대한 효능을 과학적으로 확인하였으며 관련 기능성 물질 2가지를 분리·정제함
- 기능성 물질은 Dehydroabietic acid (DAA)와 4-*epi-trans*-communic acid (4ETC)로 모두 식물의 2차 대사산물로 확인되었다. DAA와 4ETC는 *In vitro* 연구에서 ACE 억제제인 captopril처럼 ACE의 활성을 억제함. 또한 DAA와 4ETC를 포함하고 있는 솔잎착즙분말은 *In vivo* 연구에서 captopil과 유사하게 농도 의존적으로 자연발생고혈압쥐의 혈압을 감소시킴
- 인체적용시험에서 생화적 지표로 간 독성을 분석하였으며, AST가 유의적으로 증가하였으나, 정상범위였음. 항유전독성을 통해 Head DNA와 Tail DNA 유의적으로 개선되었음.
- 솔잎착즙분말의 인체적용시험 결과는 수축기 혈압, 섬유소용해, 혈관이완에 적용하여 유의적으로 혈압을 감소시킴
- 현재 국내에서 소나무는 목재로 대부분이 사용되거나 관상용 또는 일반 식품으로 사용되고 있음. 예로부터 식용이 가능한 솔잎을 이용하여 고부가가치 기능성 식품 원료를 생산한다는 측면과 이러한 기능성 원료를 섭취함으로써 국민 건강을 증진시킬 수 있다는 측면에서 의미가 있으므로 솔잎착즙분말을 활용한 건강기능식품 원료를 개발하고자 함

다. 국내·외 인정·허가 현황

(1) 국내

- 국내 인정·허가 현황을 요약하여 기술

■ 원재료 '솔잎'은 식품의 원료로 사용 가능

- 식품의 기준 및 규격(2016-43호)에 식물성 원료(1043)로 분류됨
- 식품의약품안전처와 농촌진흥청 원료DB에 식용이 가능한 원료로 분류됨

■ 신청원료

- 「식품공전」: 등재되어 있고, 식품원재료 DB검색결과 품목번호 A가105100', 품목명 '소나무'로 등재되어 있고, 사용부위는 순, 줄기, 가지, 잎, 꽃가루로 명시되어 있음
- 이명은 Korean red pine이고, 학명은 *Pinus densiflora* Sieb & Zucc.임

원재료명	소나무	
이명	Korean red pine	
학명	<i>Pinus densiflora</i> Sieb & Zucc.	
생약명	-	
원재료 분류	식물	
식품원료 사용가능 여부	가능	순, 줄기, 가지, 잎, 꽃가루
	제한적	-
	사용조건	-

○ 유사원료(소나무 잎)가 건강기능식품 기능성 원료로 인정:

인정번호	원료명	제조방법	지표성분	기능성내용	일일섭취량
2012-30호 2007-8호	솔잎증류농축액	적송( <i>Pinus densiflora</i> )의 솔잎을 수증기로 증류하여 만듦	3-carene, limonen, terpinolene	건강한 혈당의 유지에 도움을 줄 수 있음 - 2등급	1350mg
2006-1호	프랑스해안송껍질추출물	-	-	활성산소 제거 혈소판 응집 억제	50-300mg 100-300mg
				갱년기 여성 건강	g 60-200mg

(2) 국외

○ 미국 FDA

- Main term : Pine needle, DWARF, Oil (*Pinus Mugo turra* var. *Pumilio*(Haenke Zenari))
  - Document type : EFA
  - CAS RN or Other code : 8000-26-8
  - Regnum : 172.510
- Main term : Pine needle, DWARF, Oil (*Pinus Mugo turra* var. *Pumilio*(Haenke

Zenari)

- Document type : EFA
- CAS RN or Other code : 8021-29-2
- Regnum : 172.510
- EAF : Thers is reported used of the substance, but it has not yet been assigned for toxicology literature search

○ 캐나다 - Health canada



The screenshot shows the Health Canada website interface. At the top, there are logos for Health Canada and Santé Canada, along with the Canadian flag. The main header features the Health Canada logo and the URL www.hc-sc.gc.ca. Below the header is a navigation menu with links for Français, Home, Contact us, Help, Search, and canada.gc.ca. The breadcrumb trail indicates the current page is 'Home > Drugs & Health Products > Natural Health Products Ingredients Database'. The main content area is titled 'Source Material - Pinus sylvestris - Leaf'. It lists the following information: Organism: Pinus sylvestris, Part: Leaf, and Synonym(s): Lamina, Leaflet. Below this, the 'Sub-ingredient(s)' section lists: Sub-ingredient: Valeric Acid, Routes Of Administration: Oral, and References: DUKE. At the bottom of the page, there is a 'Date Modified: 2016-04-18' and a 'Top of page' link.

○ 호주 - NDPSC(National Drugs and Poisons Schedule committee)

- 솔잎 오일 섭취 시 약간의 구강독성이 일어나나, 사람에게는 미비함

라. 국내 · 외 사용 현황

(1) 국내

<유통 판매 현황 표>

제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도	유통량	기타
	[산해랑] 솔잎분말	헬스포	20-40g	식품유형 : 기타가공 품	-	식품	솔잎 100% (국내산)	분말
	지리산 새순 솔잎가루	청운당 농산	1T스푼 / 하루 2~3회(30~4 5g)	식품유형 : 기타가공 품	-	식품	솔잎가루( 새순)100 %	분말
	솔잎분말	장명식 품	3~5g/ 하루 3~4회(9~20 g)	식품유형 : 기타가공 품	-	식품	솔잎 100% (국내산)	분말
	솔잎가루	산마루 약초	3~4g/ 하루 3~4회(9~16 g)	식품유형 : 기타가공 품	-	식품	솔잎(국산) 100%	분말
	이슬나라 솔잎분말	인그리 (주)	1일 2~3회 / 1일 섭취시 3~5g을 물과 함께 섭취 (6~15g)	식품유형 : 기타가공 품	-	식품	솔잎 100% (국내산)	분말

(2) 국외

<유통 판매 현황 표>

제품사진	제품명	제조사	일일섭취량	표시내용	섭취시 주의사항	섭취용도	유통량	기타
	Pine needle powder	Kenko Yasocho [일본]	4-6g	식품	-	식품	솔잎가루 100%	분말
	Pine needle tea	Satoya mayu [일본]	1g	-	-	식품	솔잎가루 100%	분말
	Pine needle capsule	Natural Life [일본]	3-5 캡슐 1.2-2.1g	-	-	식품	솔잎가루 100%	캡슐
	Pine needle powder	Natural Life [일본]	3-5g	-	-	식품	솔잎가루 100%	분말

### 3. 지표성분(또는 기능성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료

가. 지표성분(또는 기능성분)의 규격 및 근거

○ 지표성분

- 시킴산(Shikimic acid)
- 솔잎의 1.5 ~ 2.5%로 구성되어 대표성을 지니고 있음.

나. 지표성분(또는 기능성분)의 규격

- 시킴산(Shikimic acid) 함량(mg/g) : 63.95(표시량의 80~120%)

다. 설정근거

○ 공인성적서 : 공인 시험기관 성적서

[검사기관명 : 한국기능식품연구원]

반복수 \ Lot No.	1 (Lot 20161111)	2 (Lot 20161108)	3 (Lot 20180808)	평균
1반복	66.63 (mg/mg)	73.68	52.44	63.95
2반복	65.48	71.82	53.23	
3반복	66.98	71.80	53.51	
평균	66.36	72.43	53.06	

<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>제 ID2018072033 호 공시확인</p> <p style="text-align: center;"><b>시험·검사성적서</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>제품명</td> <td>송잎차음료</td> <td>제조업체 (주명 기재)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>원재료</td> <td>인삼(생약), 버섯, 당귀, 인삼, 인삼, 인삼</td> <td>상명</td> <td>이동희</td> </tr> <tr> <td>주소</td> <td colspan="3">경기도 수원시 영통구 인평로 88, 103~110B (1층, 113차실(생약·버섯))</td> </tr> <tr> <td>제조번호</td> <td>20181111</td> <td>검수년월일</td> <td>2018-07-26</td> </tr> <tr> <td>검사뢰뢰일자</td> <td>20180720</td> <td>발주번호</td> <td>1818072033</td> </tr> </table> <p>귀회와 우리 연구원에 시험·검사뢰뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2018-07-26          시험·검사 책임자 : 이경규          검사관련 총 책임자 : 김원희</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>시험·검사항목</td> <td>시험·검사 결과</td> <td>시험·검사법</td> </tr> <tr> <td>Shikimic acid(mg/g)</td> <td>66.36(mg/g)</td> <td>정분주</td> </tr> </table> <p>한국기능식품연구원</p> </div>	제품명	송잎차음료	제조업체 (주명 기재)		원재료	인삼(생약), 버섯, 당귀, 인삼, 인삼, 인삼	상명	이동희	주소	경기도 수원시 영통구 인평로 88, 103~110B (1층, 113차실(생약·버섯))			제조번호	20181111	검수년월일	2018-07-26	검사뢰뢰일자	20180720	발주번호	1818072033	시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사법	Shikimic acid(mg/g)	66.36(mg/g)	정분주	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>제 ID2018081293 호 공시확인</p> <p style="text-align: center;"><b>시험·검사성적서</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>제품명</td> <td>송잎차음료</td> <td>제조업체 (주명 기재)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>원재료</td> <td>인삼(생약), 버섯, 당귀, 인삼, 인삼, 인삼</td> <td>상명</td> <td>이동희</td> </tr> <tr> <td>주소</td> <td colspan="3">경기도 수원시 영통구 인평로 88, 103~110B (1층, 113차실(생약·버섯))</td> </tr> <tr> <td>제조번호</td> <td>20180808</td> <td>검수년월일</td> <td>2018-08-14</td> </tr> <tr> <td>검사뢰뢰일자</td> <td>20180808</td> <td>발주번호</td> <td>1808081293</td> </tr> </table> <p>귀회와 우리 연구원에 시험·검사뢰뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2018-08-14          시험·검사 책임자 : 이경규          검사관련 총 책임자 : 김원희</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>시험·검사항목</td> <td>시험·검사 결과</td> <td>시험·검사법</td> </tr> <tr> <td>Shikimic acid(mg/g)</td> <td>72.43(mg/g)</td> <td>정분주</td> </tr> </table> <p>한국기능식품연구원</p> </div>	제품명	송잎차음료	제조업체 (주명 기재)		원재료	인삼(생약), 버섯, 당귀, 인삼, 인삼, 인삼	상명	이동희	주소	경기도 수원시 영통구 인평로 88, 103~110B (1층, 113차실(생약·버섯))			제조번호	20180808	검수년월일	2018-08-14	검사뢰뢰일자	20180808	발주번호	1808081293	시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사법	Shikimic acid(mg/g)	72.43(mg/g)	정분주	<div style="border: 1px solid black; padding: 5px;"> <p>제 ID2018081294 호 공시확인</p> <p style="text-align: center;"><b>시험·검사성적서</b></p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>제품명</td> <td>송잎차음료</td> <td>제조업체 (주명 기재)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>원재료</td> <td>인삼(생약), 버섯, 당귀, 인삼, 인삼, 인삼</td> <td>상명</td> <td>이동희</td> </tr> <tr> <td>주소</td> <td colspan="3">경기도 수원시 영통구 인평로 88, 103~110B (1층, 113차실(생약·버섯))</td> </tr> <tr> <td>제조번호</td> <td>20181111</td> <td>검수년월일</td> <td>2018-08-14</td> </tr> <tr> <td>검사뢰뢰일자</td> <td>20180808</td> <td>발주번호</td> <td>1808081294</td> </tr> </table> <p>귀회와 우리 연구원에 시험·검사뢰뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2018-08-14          시험·검사 책임자 : 이경규          검사관련 총 책임자 : 김원희</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td>시험·검사항목</td> <td>시험·검사 결과</td> <td>시험·검사법</td> </tr> <tr> <td>Shikimic acid(mg/g)</td> <td>72.43(mg/g)</td> <td>정분주</td> </tr> </table> <p>한국기능식품연구원</p> </div>	제품명	송잎차음료	제조업체 (주명 기재)		원재료	인삼(생약), 버섯, 당귀, 인삼, 인삼, 인삼	상명	이동희	주소	경기도 수원시 영통구 인평로 88, 103~110B (1층, 113차실(생약·버섯))			제조번호	20181111	검수년월일	2018-08-14	검사뢰뢰일자	20180808	발주번호	1808081294	시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사법	Shikimic acid(mg/g)	72.43(mg/g)	정분주
제품명	송잎차음료	제조업체 (주명 기재)																																																																														
원재료	인삼(생약), 버섯, 당귀, 인삼, 인삼, 인삼	상명	이동희																																																																													
주소	경기도 수원시 영통구 인평로 88, 103~110B (1층, 113차실(생약·버섯))																																																																															
제조번호	20181111	검수년월일	2018-07-26																																																																													
검사뢰뢰일자	20180720	발주번호	1818072033																																																																													
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사법																																																																														
Shikimic acid(mg/g)	66.36(mg/g)	정분주																																																																														
제품명	송잎차음료	제조업체 (주명 기재)																																																																														
원재료	인삼(생약), 버섯, 당귀, 인삼, 인삼, 인삼	상명	이동희																																																																													
주소	경기도 수원시 영통구 인평로 88, 103~110B (1층, 113차실(생약·버섯))																																																																															
제조번호	20180808	검수년월일	2018-08-14																																																																													
검사뢰뢰일자	20180808	발주번호	1808081293																																																																													
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사법																																																																														
Shikimic acid(mg/g)	72.43(mg/g)	정분주																																																																														
제품명	송잎차음료	제조업체 (주명 기재)																																																																														
원재료	인삼(생약), 버섯, 당귀, 인삼, 인삼, 인삼	상명	이동희																																																																													
주소	경기도 수원시 영통구 인평로 88, 103~110B (1층, 113차실(생약·버섯))																																																																															
제조번호	20181111	검수년월일	2018-08-14																																																																													
검사뢰뢰일자	20180808	발주번호	1808081294																																																																													
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사법																																																																														
Shikimic acid(mg/g)	72.43(mg/g)	정분주																																																																														

그림. 공인 시험기관 지표물질 분석 성적서

#### 4. 안전성에 관한 자료

< 건강기능식품 기능성원료의 안전성평가를 위한 의사결정도

>

○ 의사결정도 “나” 해당

#### 가. 섭취근거 정보

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

데이터베이스	검색어	검색결과	안전성 관련 정보 건수	참고 문헌
IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i>	1	0	
AHRQ (Agency for healthcare research and quality)		-	-	
Institute of medicine (IOM) dietary reference intakes		-	-	
GRAS (Generally recognized as safe)		1	0	
EFSA (European food safety authority)		9	0	
Health Canada		14	0	
국내 학술 데이터베이스 (DBPia)	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i> , 솔잎	9	2	1-2
Institute of Medicine	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i>	-	-	
Agency for healthcare research and quality	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i>	-	-	
German commission E - monographs	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i>	1	1	3
European scientific cooperative on phytotherapy (2015)	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i>	-	-	
Natural medicine comprehensive database	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i>	6	-	
Natural standard	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i> , Pin de Coree	1	1	4-5
	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i> , Pin de Monterey	1	1	6
	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i> , Pine bark extract	1	1	7
Physician's Desk Reference for Nutritional Supplements	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i>	-	-	

American herbal pharmacopoeia	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i>	-	-	
Toxline	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i>	-	-	
FDA Poisonous plant database	Pine needles, <i>Pinus densiflora</i>		<b>22</b>	8-23

○ 국내 학술 데이터베이스(DBPia)

- 소나무 종 : *Pinus densiflora*

- 사용 부위 : 잎

- 솔잎분말 2%(20g)와 10%(100g) 섭취 시 Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), 혈중 요소 농도 (BUN)에 영향을 미치지 않음. 솔잎 20%(200g) 섭취 시 AST와 ALT 증가되므로 과도한 솔잎 섭취는 쥐의 간에 손상을 줄 수 있음 [참고문헌 1]

- 소나무 껍질 에탄올 추출물 5000 mg/kg의 single oral dose는 쥐의 사망 또는 내장 기관에 영향을 미치지 않음. Seven-day repeated-dose 실험에서 시험 기간 동안 소나무 껍질 에탄올 추출물(100, 1000, 5000 mg/kg)은 독성이 나타나지 않았으며 무게와 장기 무게에 영향을 미치지 않음 [참고문헌 2]

○ German commission E - monographs [참고문헌 3]

- 소나무 종 : *Pinus sylvestris*

- 사용 부위 : Pine needle Oil

- 피부와 점막의 자극, 기관지 경련

○ Natural standard - 소나무 종 : Korean pine (*Pinus koraiensis*) [참고문헌 4-5]

- 사용 부위 : Nut oil (Grade : Good scientific evidence)

- 알레르기, 비 알레르기성 어린이, 임신 또는 모유 수유중인 여성, 출혈의 위험이 있는 약제, 혈압을 낮추는 약 또는 지질 수준을 낮추는 약제를 사용하는 사람들은 주의해야함. Pinus 또는 Pinaceae 계통의 식물에 대해 알려진 알레르기가 있거나 견과류에 대한 알레르기가 있는 어린이는 주의

○ Natural standard - 소나무 종 : Monterey pine (*Pinus radiata*) [참고문헌 6]

- 사용 부위 : Nut oil

- 혈압 강하제를 복용하는 환자나 혈압 장애가 있는 환자, 지방 또는 콜레스테롤 수치가 높은 환자는 주의

- 꽃가루와 같은 알레르기 또는 Pinacease에 대한 알려진 알레르기 주의

- 임신 중이거나 모유 수유 중일 경우 피할 것

○ Natural standard - 소나무 종 : French maritime pine bark extract (*Pinus pinaster*) [참고문헌 7]

- 사용 부위 : pine bark extract (Grade : Good scientific evidence; Asthma, Circulation problems, Heart disease risk)
- 당뇨병 또는 혈당이 낮은 사람, 혈당에 영향을 미치는 약물, 허브, 또는 보충제를 복용하는 사람은 주의
- 출혈 위험이 있거나 출혈의 위험이 있는 약을 복용하는 환자에게는 주의
- 혈압을 낮추는 보충제에 주의
- 자가면역 질환, 심장 질환, 간 질환 및 위장 장애가 있거나 면역계에 영향을 미치는 약물을 복용하는 사람은 주의
- 프랑스 해송 껍질 추출물에 알레르기 또는 민감하면 피해야함
- 임신 3개월 동안은 피해야함

○ FDA Poisonous plant database

- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus* sp.) [참고문헌 8]
  - 사용 부위 : needles
  - 임신한 소(임신 기간의 마지막 3달)가 솔잎을 먹을 경우 유산이 2주 이내에 발생.
- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus ponderosa*) [참고문헌 9]
  - 사용 부위 : needles
  - 임신 후기의 소들이 솔잎을 먹을 경우 조기 출산을 초래함
- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus ponderosa*) [참고문헌 10]
  - 사용 부위 : needles
  - 임신 후기의 소들이 솔잎을 먹을 경우 조기 출산을 초래함
- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus koraiensis*) [참고문헌 11]
  - 사용 부위 : needles
  - 솔잎 섭취는 serum 17 beta-estradiol 농도 증가, progesterone 농도를 감소시켜 젖소의 유산에 영향을 줄 수 있음
- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus ponderosa* Lawson) [참고문헌 12]
  - 사용 부위 : needles
  - 솔잎 섭취는 임신한 소의 유산을 일으킴
- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus ponderosa* Lawson) [참고문헌 13]
  - 사용 부위 : needles
  - 겨울에 폰 데로 사 소나무 잎을 섭취한 임신한 소는 유산을 일으킬 수 있음
- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus ponderosa* Lawson) [참고문헌 14]
  - 사용 부위 : needles

- 임신한 소(후반부)에 솔잎의 섭취는 유산을 일으키며 이러한 유산은 스테로이드 대사와 직접적 또는 관련이 있을 수 있음
- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus ponderosa*) [참고문헌 15]
  - 사용 부위 : needles
  - 임신한 소(후반부)에 폰 데로 사 솔잎의 섭취는 유산을 일으킴
- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus contorta*) [참고문헌 16]
  - 사용 부위 : needles
  - 솔잎 4.5~5.5kg을 250일 동안 소에게 먹임. Isocupressic acid (ICA) 함량은 0.8%로 62~72mg ICA/kg을 소비함
  - 솔잎 섭취 3~4일 후 유산 증상 발생
- 소나무 종 : Pine needle [참고문헌 17]
  - 사용 부위 : needles
  - 솔잎을 섭취한 소 중 스트레스를 받게 되면 유산을 일으킬 수 있음
- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus ponderosa*) [참고문헌 18]
  - 사용 부위 : needles
  - 솔잎은 생쥐의 생식 기능 장애를 일으킴
  - 초기 임신 기간 동안 섭취는 태아 독성(기형)이 나타남
  - 임신 15일 이전에는 태아 사망이 거의 관찰되지 않지만, 16일째에는 태아 사망이 80%에 이름
- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus ponderosa*) [참고문헌 19]
  - 사용 부위 : needles
  - 임신 한 소가 3개월 동안 솔잎을 섭취하게 되면 유산이 유도됨
- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus ponderosa*) [참고문헌 20]
  - 사용 부위 : needles
  - 임신 전 30마리의 암양에 솔잎을 먹여도 estous cycles은 변하지 않음
  - 37% 솔잎을 먹은 암양은 어떠한 독성 효과도 나타나지 않음
- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus ponderosa*) [참고문헌 21]
  - 사용 부위 : needles
  - 임신 말기에 솔잎을 섭취한 암소는 자궁 수축으로 유산이 일어날 수 있음
- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus ponderosa* Laws) [참고문헌 22]
  - 사용 부위 : needles
  - 솔잎의 Crude acid fraction을 임신한 소에 먹일 경우 유산이 유발됨

- 주요 성분 : Four long-chain fatty acids (palmitic, linoleic, oleic, and stearic acids), and Two labdane diterpene acids (imbricataloic and isocupressic acids).

- 임신 250일부터 Isocupressic acid(99~152mg/kg) 투여 시 유산이 됨

- 소나무 종 : Pine needle (*Pinus ponderosa* Laws) [참고문헌 23]

- 사용 부위 : needles
- 솔잎의 구성 성분 중 유산을 일으키는 솔잎 분획 조사
- 메틸렌 클로라이드 층에서 임신한 소의 유산이 발생함

○ 기능성분, 원재료 또는 기타 관련물질에 대하여 알려져 있는 안전성 또는 독성 정보, 국내·외에서 학술지에 게재된 자료와, 국내·외 정부보고서 또는 국제기구 보고서 그리고 관련 데이터베이스의 검색결과를 기술

IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans	- 부작용 관련 보고 없음
AHRQ (Agency for healthcare research and quality)	- 부작용 관련 보고 없음
Institute of medicine (IOM) dietary reference intakes	- 부작용 관련 보고 없음
GRAS (Generally recognized as safe)	- 부작용 관련 보고 없음
EFSA (European food safety authority)	- 부작용 관련 보고 없음
Health Canada	- 부작용 관련 보고 없음
국내 학술 데이터베이스 (DBPia)	○ 소나무 사용 부위 : 잎 ( <i>Pinus densiflora</i> ) ○ 주의 - 쥐에 솔잎 200g/kg을 경구 투여 시 AST와 ALT가 증가됨
Institute of Medicine	- 부작용 관련 보고 없음
Agency for healthcare research and quality	- 부작용 관련 보고 없음
German commission E - monographs	○ 소나무 사용 부위 : needle oil ○ 피부, 점막 자극 또는 기관지 경련이 보고됨 ○ 관련 문헌 요청
European scientific cooperative on phytotherapy (2015)	- 부작용 관련 보고 없음
Natural medicine	- 부작용 관련 보고 없음

comprehensive database	
Natural standard	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 소나무 사용 부위 : Pine needle Oil, Nut Oil, Pine bark extract <ul style="list-style-type: none"> <li>- Korean pine (Pinus Koraiensis; Good scientific evidence), Monterey pine (Pinus radiata), French maritime pine bark extract (Pinus pinaster; Good scientific evidence)</li> </ul> </li> <li>○ 주의 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 알레르기 환자 또는 Pinus 계통 식물에 대한 알레르기</li> <li>- 임신 또는 모유 수유 중인 여성</li> <li>- 출혈이 있는 약제</li> <li>- 혈압을 낮추는 약 또는 지질 수준을 낮추는 약제</li> <li>- 지방 또는 콜레스테롤 수치가 높은 환자</li> <li>- 당뇨병 또는 혈당이 낮은 사람</li> <li>- 혈당에 영향을 미치는 약물, 허브 또는 보충제를 복용하는 사람</li> <li>- 면역, 심장, 간, 위장 장애가 있는 환자</li> </ul> </li> </ul>
Physician's Desk Reference for Nutritional Supplements	- 부작용 관련 보고 없음
American herbal pharmacopoeia	- 부작용 관련 보고 없음
Toxline	- 부작용 관련 보고 없음
FDA Poisonous plant database	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 소나무 사용 부위 : Pine needle Oil, Nut Oil, Pine bark extract <ul style="list-style-type: none"> <li>- Korean pine (Pinus Koraiensis; Good scientific evidence), Monterey pine (Pinus radiata), French maritime pine bark extract (Pinus pinaster; Good scientific evidence)</li> </ul> </li> <li>○ 주의 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 임신한 소(임신 기간의 마지막 3달)가 솔잎을 먹을 경우 유산이 2주 이내에 발생.</li> <li>- 임신 후기의 소들이 솔잎을 먹을 경우 조기 출산을 초래함</li> </ul> </li> </ul>

나. 섭취량 평가 정보

○ 제안 일일 섭취량 : 솔잎착즙분말로서 3g/일 (원재료 솔잎으로서 1일 10.7 g에 해당)

○ 솔잎착즙분말의 섭취량 자료

- 동의보감 : 내경편-신형-단방-송지(송진)

- 服藥法, 取葉細切, 更研, 酒下三錢. 亦可粥飲和服. 亦可以炒黑大豆, 同搗作末, 溫水調服 : 오래 먹으면 몸이 가벼워지고 늙지 않으며 수명이 늘어난다. 송진을 정제하는 방법은 다음과 같다. 송진 4.2kg을 뽕나무 잣물 10말(180L)과 함께 3번 끓여 오르게 끓인 후 찬물에 넣어 굳어지게 한 다음 다시 끓인다. 이 과정을 10번 반복하면 흰색이 된다. 이렇게 정제한 송진을 뽕아 채로 쳐서 순주(醇酒)·꿀과 섞어서 옛처럼 만들어 하루에 1냥씩 먹는다. 《득효방》

- 服藥法, 取葉細切, 更研, 酒下三錢. 亦可粥飲和服. 亦可以炒黑大豆, 同搗作末, 溫水調服, 更佳. 《俗方》: **솔잎을 먹는 방법**은 다음과 같다. 잎을 따서 얇게 썬 후 다시 갈아 술에 **3돈(11.25g; 1돈 : 3.75g)**씩 먹는다. 미음과 함께 먹어도 좋다. 검게 볶은 콩을 함께 찌어서 가루 내어 따뜻한 물에 타서 먹으면 더욱 좋다. 《속방》
- 한국인의 솔잎착즙분말 섭취량 자료는 동의보감 자료를 근거로 섭취량을 평가함
  - 솔잎착즙분말의 제안섭취량(3.15g)은 동의보감에서 제시하고 있는 11.25g의 3배를 상회하지 않음
  - 따라서, **섭취량이 증가하지 않은 것으로 평가됨**

## 5. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료

### 가. 섭취량 및 근거

- 섭취량 및 섭취방법 : 1일 3g 섭취
- 근거내용 : 동물실험을 통해 확인 300mg/kg를 인체적용시험에 적용하여 산출

### 나. 섭취방법 및 근거

- 섭취방법 : 캡슐
- 국내 근거
  - 솔잎은 식품의 기준 및 규격(2016-43호)에 식물성 원료(1043)로 분류되어 있음
  - 식품의약품안전처와 농촌진흥청 원료DB에 식용이 가능한 원료로 분류되어 있음
  - 유사원료인 솔잎증류농축액(인정번호 제2007-8호, 제2012-30호)과 프랑크해안송껍질추출물(인정번호 제2006-1호) 이 건강기능식품 기능성 원료로 인정됨
- 국외 근거
  - 미국 FDA에서 식물성 원료로 분류되어 있음
- 국내·외 사용현황
  - 국내 : 솔잎착즙액, 솔잎발효액, 환 등 제품이 판매되고 있음
  - 미국, 일본, 중국 등 : 국내 솔잎 제품이 미국에서 판매되고 있음

### 다. 섭취 시 주의사항 및 근거

- 섭취 시 주의사항
  - 알레르기 환자(피부 및 기관지 포함) 또는 Pinus 계통 식물에 대한 알레르기
  - 임신 또는 모유 수유 중인 여성
  - 출혈이 있는 약제
  - 혈압을 낮추는 약 또는 지질 수준을 낮추는 약제
  - 지방 또는 콜레스테롤 수치가 높은 환자
  - 당뇨병 또는 혈당이 낮은 사람
  - 혈당에 영향을 미치는 약물, 허브 또는 보충제를 복용하는 사람
  - 면역, 심장, 간, 위장 장애가 있는 환자
- 근거내용 : German commission E - monographs와 Natural standard에 따르면 알레

르기, 임신 또는 모유 수유 중인 여성, 고혈압 환자, 콜레스테롤 환자, 당뇨병 또는 혈당이 낮은 사람, 면역, 심장, 간, 위장 장애가 있는 사람들은 술일 섭취 시 주의가 필요하다고 제시하고 있음

## 6. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료

가. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약처 고시 제2016-63호, ' 16.6.30)」 제 2. 1-1 ' 건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료 '에 해당하지 않음

나. 의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부

- 「건강기능식품의 기준 및 규격(식약처 고시 제2016-63호, ' 16.6.30)」 제 2. 1-1 ' 건강기능식품 제조에 사용할 수 없는 원료 ' 2)의약품의 용도로만 사용되는 원료 등 섭취방법 또는 섭취량에 대해 의·약학적 전문 지식을 필요로 하는 것에 해당하지 않음

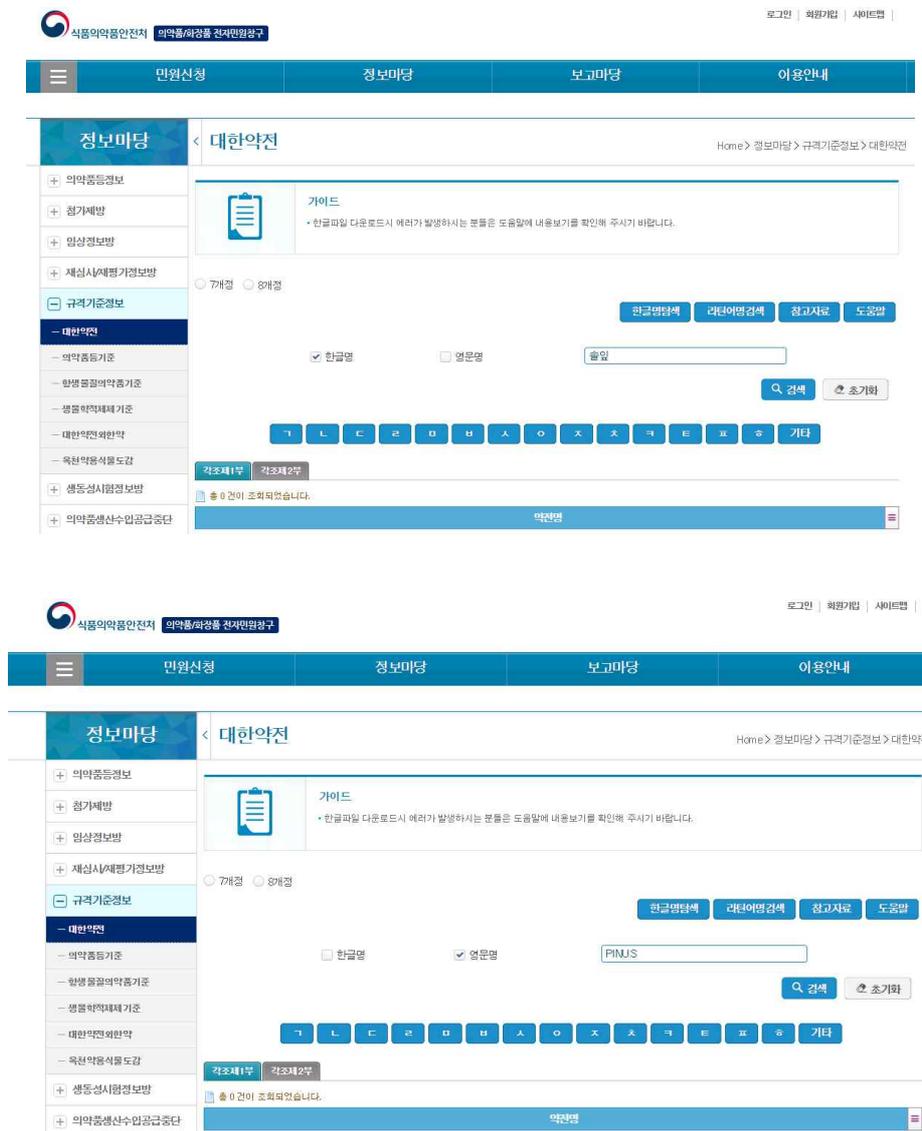


그림 56. 대한약전

## 7. 개별인정형 기능성 원료 신청

### 건강기능식품 기능성원료 인정(신규 신청)

접수번호: 20181128383 신청취소

**민원신청 진행현황**

신청



접수



담당자배정



검토



처리완료



번호	처리내용	처리일시	부서	담당
1	신청	2018.12.31	식품의약품안전평가원 영양 기능연구팀	

그림 57. 개별인정형 기능성 원료 온라인 신청

## 제 8 절. 체지방 개선 건강기능식품 시제품 개발 및 일반 제품개발

### 1. 솔잎생산 농가(영농조합) 및 유통업체와의 MOU체결

가. MOU 체결 : 부곡식품

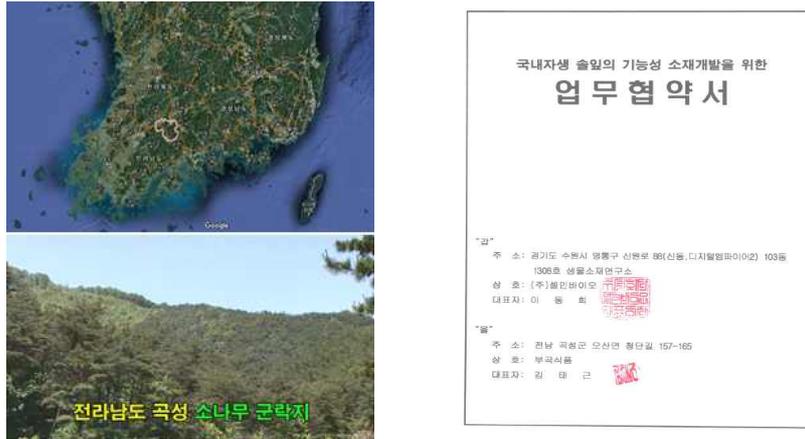


그림 58. 부곡식품과의 MOU 체결

### 2. 식품의약품 안전처 벤처제조업 등록 및 벤처제조업 임가공 계약체결

가. 벤처제조업 영업허가 획득 : 허가번호 제 20180006066 호

나. 벤처제조업 임가공계약서 체결 : (재)전남생물산업진흥원 식품산업연구센터



그림 59. 벤처제조업 등록 및 전남식품산업연구센터와의 임가공 계약체결

### 3. 솔잎착즙분말의 유통기한 설정시험

가. 솔잎착즙분말의 유통기한 설정시험 조건 및 측정 항목

(1) 시험방법

- (가) 수분 : 식품공전 7. 일반시험법, 2. 식품성분시험법, 2.1 일반성분시험법, 2.1.1 수분, 2.1.1.1 건조감량법
- (나) 세균 수 : 식품공전 7. 일반시험법, 4. 미생물시험법, 4.5 세균수, 4.5.1 일반세균수
- (다) 대장균군: 식품공전 7. 일반시험법, 4. 미생물시험법, 4.7 대장균군, 4.7.1 정성

구분	내용	비고
원료 제품	1. 원료 : 솔잎착즙분말 100%(동결건조) 2. 포장 : 알루미늄 폴리에틸렌(AL+PE)	
실험 조건	1. 저장 온도 : 25°C, 35°C, 45°C 2. 상대 습도 : 60±5 % 3. 저장 기간 : 90일(3개월) 4. 시험 주기 : 0, 30일, 60일, 90일	
측정 항목	1. 색상 : 솔잎향이 나는 녹색 분말 2. 수분 : 10.0% 이하여야 한다. 3. 세균 수 : 100(CFU/g) 이하여야 한다. 4. 대장균군 : 음성이여야 한다. 5. Shikimic acid : 63.95mg/g(80~120%)여야 한다.	 기준, 규격

나. 저장 중 원료의 품질변화

Table 36. 솔잎착즙분말의 가속실험 중 성분 및 미생물 변화 결과

시험항목	저장기간 (개월)	저장 온도 (습도)			규격	기준함량 의 80~120%	결과
		25	35	45			
수분(%)	0	5.7	5.7	5.7	10.0 이하	-	적합
	1	5.7	5.9	5.3			
	2	5.9	5.8	5.5			
	3	5.7	5.8	5.5			
세균수 (CFU/g)	0	0	0	0	100 이하	-	적합
	1	0	0	0			
	2	0	0	0			
	3	0	0	0			
대장균군 (음성)	0	음성	음성	음성	음성	음성 이어야함	적합
	1	음성	음성	음성			
	2	음성	음성	음성			
	3	음성	음성	음성			
Shikimic acid(mg/g)	0	59.8	59.8	59.8	63.95	51.2 ~ 76.7	적합
	1	56.8	54.4	57.7			
	2	57.8	61.9	54.3			
	3	55.8	57.4	62.0			

다. 저장 중 원료의 성상 변화

솔잎착즙분말은 보존 3개월의 가속실험 중 경화 및 갈변현상이 발생하지 않음

Table 37. 솔잎착즙분말의 가속실험 중 성상 변화 결과

시험항목	저장기간 (개월)	저장 온도 (습도)			규 격	결 과
		25	35	45		
성 상	0				솔잎향이 나는 녹색분말	적합
	1					적합
	2					적합
	3					적합

라. 실험 결과

○ 솔잎착즙분말은 알루미늄박 폴리에틸렌(AL+PE) 포장된 상태로 25℃, 35℃, 45℃에서 3개월간 저장하면서 주요 품질 지표인 Shikimic acid 함량, 수분, 세균수, 대장균군, 성상의 변화를 측정한 결과 모두 기준 규격을 유지함(Table 36, 37)

4. 솔잎착즙분말 제품개발

가. 제품 개발

원료	기 능 성
코엔자임Q10(미국)	① 항산화에도움을 줄 수 있음 ② 높은 혈압 감소에 도움을 줄 수 있음
산화아연	① 정상적인 면역기능에 필요 ② 정상적인 세포분열에 필요
비타민B1질산염	① 탄수화물과 에너지 대사에 필요
비타민B2	① 체내 에너지 생성에 필요
정제어유(18/12,ONC,신규)	① 혈중 중성지질 개선·혈행 개선에 도움을 줄 수 있음
포도씨유	
솔잎착즙분말	
유산균사균체	
대두레시틴(2F-UB)	
밀납(백납)	

나. 제품 디자인 개발



그림 60. 제품 및 디자인 개발

다. 제품화 및 물품공급계약



거래 계약서

품 명	혈압엔큐텐
업 체 명	㈜셀인바이오
계약기간	2018년 04월 12일 - 2019년 04월 11일

그림 61. 제품화 및 물품공급계약

# 제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

## 제 1 절. 연도별 연구목표 및 달성도

### 1. 정성적 평가

구 분	연 도	연구개발의 목표	달성도(%)	연구개발의 내용
1차년도	2016	○ 솔잎착즙분말 원료의 성분 및 시험 성적서 작성	100	○ 솔잎착즙분말의 영양분석 및 중금속 시험 공인시험성적서 결과확인 ○ 솔잎착즙분말의 규격화를 위한 지표 물질의 설정
		○ 솔잎착즙분말의 원료 및 제조 공정 표준화	100	○ 솔잎착즙분말의 지표물질 선정 및 validation ○ 솔잎착즙분말의 생산조건 확립을 위한 제조 공정의 확립
2차년도	2017	○ 솔잎착즙분말의 안전성 평가 자료 확보 및 요약서 작성	100	○ 안전성 평가 의사결정도에 따른 솔잎착즙분말의 안전성 평가 ○ 솔잎착즙분말에 대한 섭취량 평가 자료 확보 ○ 솔잎착즙분말에 대한 안전성 자료 확보 ○ 영양평가자료 분석 및 요약서 작성
		○ 솔잎 착즙분말의 체지방 개선 효능 <i>In vivo</i> 연구	100	○ 고지방식이 동물모델을 이용한 솔잎착즙분말의 체지방 감소 효능 검증 : 체중, 식이섭취량, 식이효율, 혈액 분석, 장기 무게 측정
		○ 솔잎착즙분말의 체지방 및 혈중 지질대사 개선 효능 분석	100	○ IRB 심의 신청 및 대상자 모집 ○ 인체적용시험 대상자들의 스크리닝 : 신 체계측치(Inbody, DEXA), 혈압, 혈당 분석
3차년도	2018	○ 솔잎착즙분말을 이용한 다양한 시제품 개발	100	○ 제품의 제형 및 제품 개발
		○ 솔잎착즙분말의 체지방 개선 기전 분석	100	○ 솔잎착즙분말 건강기능식품 유통 판매 ○ 솔잎착즙분말의 체지방 개선 작용 기작 규명
		○ 비만대사 및 항산화대사 개선 효능과 솔잎착즙분말 생체 이용률 분석	100	○ 인체적용시험을 통한 비만대사 및 항산화 대사 개선 효능과 솔잎착즙분말의 생체 이용률 분석
		○ 체지방 개선에 대한 식품의약품안전평가원에 개별인정신청	100	○ 식품의약품안전처 개별인정형 기능성 원료 신청

## 2. 정량적 평가

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용홍보		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		논문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SCI	비 SCI						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백만 원	백만 원	백만 원	백만 원	명	백만 원	건	건	건	건	명	건	건			
1차 년 도	목 표 1							1					2							
	실 적 1							2					7					1		
2차 년 도	목 표							1			1	3	4		3					
	실 적 1							2					5		3					
3차 년 도	목 표	1	1			1	20 0	1			2	3	5		7			1		
	실 적		1			1	53				1	2	14		6			3		
소 계	목 표	2	1			1	20 0	3			3	6	11		10			1		
	실 적	2	1			1	53	4			1	2	26		9			4		

## 3. 연구성과

### 가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저 자명	호	국명	발행 기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	비고
1	Comparative antioxidant activity and structural feature of protocatechuic acid and phenolic acid derivatives by DPPH and intracellular ROS	Letters in Drug Design & Discovery		14	국외		SCI	2018.06.01	
2	이상지질혈증 동물 모델을 이용한 솔잎 착즙액 첨가 설기떡의 지질개선 효과 검증	Journal of Nutrition and Health		vol. 52, no.1	국내	한국영양학회	비SCI	2019.02.28	
3	솔잎 착즙액 첨가 설기떡 투여가 고지방식이 유도 비만 래트의 체지방 및 항산화 대사에 미치는 영향	한국식품영양과학회지		제48권 제2호	국내	한국식품영양학회	비SCI	2019.08.2.28	

### 나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	Interaction Study of Resistance y MHD and Potato Virus YO for Development of		2017.11.08	경주화백	대한민국

	Virus-Resistant Solanum tuberosum L.				
2	Anti-Adipogenic Effects on 3T3-L1 Preadipocytes from Funtional Plant P inus densiflora sieb. et zucc Needles		2017.11.08	경주화백	대한민국
3	Attenuation of UVB Induced MMP-1 and Inflammation Factor Expression in HaCaT Cells by Needle Extract of P . densiflora		2017.11.08	경주화백	대한민국
4	The Anti-Obesity Effect of P inus densiflora Sieb. et Z ucc. in Mice		2017.11.08	경주화백	대한민국
5	건강기능식품 원재료 확대 및 기능성 추가를 위한 조사 및 분석 연구		2017.11.08	경주화백	대한민국
6	Functional Investigation of Pine( <i>Pinus densiflora Siebold&amp;Zucc.</i> ) needle fraction extract		2016.11.01.	제주컨벤션	대한민국
7	Isolation and characterization of dehydroabietic acid and communie acid from Pinus densiflora needles and anti-hypertensive effect of Pinus densiflora needles on spontaneously hypertensive rats		2016.11.02	제주 컨벤션	대한민국
8	Comparative study of the Structure and Antioxidant Activity of Protocatechuic Acid and Phenolic Acid Derivatives		2016.11.02	제주 컨벤션	대한민국
9	Fibrin Polymerization Inhibition and Fibrin Clot Lysis by PCA and Its Derivatives Isolated from Pinus densiflora		2016.11.02	제주 컨벤션	대한민국
10	Isolation and characterization of angiotensin converting enzyme inhibitor from Pinus densiflora needles and antihypertensive effect of Pinus densiflora needles on spontaneously hypertensive		2016.10.13	광주 김대중 컨벤션	대한민국
11	Comparative study between Structure and Antioxidant Activity of Protocatechuic Acid and Phenolic Acid Derivatives using DPPH, ROS and intracellular ROS		2016.10.13	광주 김대중 컨벤션	대한민국
12	Thrombolytic activity of Protocatechuic acid and Its Derivatives Isolated from Pinus densiflora		2016.10.13	광주 김대중 컨벤션	대한민국
13	Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by Funtional Plant P. densiflora		2018.01.18	도쿄메이 지대학	일본
14	Bioactivity of UVB Induced Skin Inflammation Factor in HaCaT cells by Needle Extract of P. densiflora		2018.01.18	도쿄메이 지대학	일본
15	Influence of Potato Virus YO in autophagy of Nicotiana benthamiana.		2018.01.18	도쿄메이 지대학	일본
16	Effect of pine needle extract reduces waist and hip circumferences in overweight subject		2018.10.18	평창알펜 시아	대한민국
17	Isolation and characterization of Abieta-8,11,13-trien-18-oic and 8(17),12,14-labdatriene-19-oic acid from Pinus densiflora needles and antihypertensi		2018.11.01	부산벙스코	대한민국
18	Effects of Pine Needle Extract on Blood Pressure and PAI-1 Levles in Overweight Subjects		2018.11.01	부산벙스코	대한민국
19	The anti-cancer potential of hexane extract from Pinusdensifloraon human gastric cancer cell lines		2018.11.01	부산벙스코	대한민국
20	Malonic acid from P. densifloraInhibit UVB-induced Oxidant stress and Inflammation in HaCaTkeratinocytes		2018.11.01	부산벙스코	대한민국
21	A comprehensive study on glutamine synthetases during the reproductive stage of rice		2018.11.01	부산벙스코	대한민국
22	Induction of Autophagy in Tobacco Plants against Potato Virus Yo(PVYo)		2018.11.01	부산벙스코	대한민국
23	Physiological Roles of Autophagy in Biotic Stress Responses		2018.12.20	방콕	태국
24	Malonic acid in Pinus densiflora Protective against UVB Irradiation-Induced Oxidant stress		2018.12.20	방콕	태국

	and Inflammation in HaCaT keratinocytes				
25	Inhibition of cell cycle progression by an hexane extract of pinus densiflora in gastric cancer cell lines			2018.12.20	방콕 태국
26	Antihypertensive effect of Abieta-8,11,13-triene-18-oic and 8(17),12,14-labdatriene-19-oic acid isolated from Pinus densiflora Sieb. et Zucc in SHR			2018.12.20	방콕 태국

다. 지식재산권

No	지식재산권 등 명칭	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	솔잎착즙분말을 유효성분으로 포함하는 항비만 조성물	대한민국	조선대학교산학협력단	2016.09.26	10-2016-0123180				100
2	ANTI-OBESITY COMPOSITION COMPRISING PINE NEEDLE JUICE POWDER AS EFFECTIVE COMPONENT	USA	조선대학교산학협력단	2017.09.25	15/713,706				100
3	솔잎착즙분말을 유효성분으로 포함하는 항비만 조성물	대한민국				조선대학교산학협력단	2018.03.29	10-1845265-0000	100

라. 전문인력양성

No	분류	기준 년도	현 황										
			학위별(취득, 수료, 취업)				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2017	1		2		2	1	1			2	
2		2018	1	7		1	4	5				9	

마. 산업기술 인력양성

No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
1	품질관리인 교육	벤처제조업 품질관리인(신규)	한국건강기능식품협회	년 1 회	6	1

라. 고용창출

No	분류	기준 년도	현 황										
			학위별(취득, 수료, 채용)				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1		2016		1	1		1	1	2				직접고용
2		2017		1	1		1	1	2				직접고용

마. 사업화 성과 및 매출실적

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액(백만원)		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	B2B	직접개발	국내	제품화	솔잎착즙분말 건강기능식품개발	(주)N**	53	-	2018	20년

바. 홍보 및 전시

No	홍보유형	행사명칭 (매체명)	지역(일시)	제목 및 내용	이미지
1	박람회	2016 COSMOPROF ASIA	홍콩 (2016.11.15. ~2016.11.18.)	솔잎착즙분말 원료 전시	
2	일간지	중도일보	국내 (2018.06.05.)	'네이트리팜' 신제품 '혈압엔큐텐' 출시	
3	일간지	그린데일리	국내 (2018.06.05.)	4중 복합 기능성 건강기능식품 '혈압엔큐텐' 출시	
4	일간지	넥스트데일리	국내 (2018.06.06.)	'네이트리팜' 혈압엔큐텐 출시	

#### 4. 목표달성에 대한 차후 방향

- 가. 개발된 제품의 매체 및 전시회를 통한 홍보활동을 진행하여 매출향상
- 나. 솔잎착즙분말을 활용한 식품 및 화장품 등의 추가 제품 개발을 진행
- 다. 동물실험 및 인체적용시험 결과를 바탕으로 논문 작성

## 제 4 장. 연구결과의 활용 및 계획

### 제 1 절. 실용화 산업화 계획

#### 1. 생산 계획

구분		(2019년) 개발 종료 후 1년	(2020년) 개발 종료 후 2년	(2021년) 개발 종료 후 3년
국 내	시장점유율(%)	0.001	0.002	0.003
	판매량(단위:EA)	3,000	4,000	6,000
	판매단가(원)	100,000	100,000	100,000
	국내매출액(억원)	3	4	6
해 외	시장점유율(%)	-	0.00001	0.00002
	판매량(단위:EA)	-	1,000	3,000
	판매단가(\$)	-	100	100
	해외매출액(백달러)	-	1,000	3,000
당사 생산능력		50,000 box	50,000 box	100,000 box

※ 국내 시장점유율은 2017년 기준 시장규모(2조 2374억원)을 참고로 계산함(2018년 식약처)

※ 국외 시장점유율은 2014년 기준 시장규모(미국과 일본 159,300백만 달러)를 참고로 계산함(NBJ's Global Supplement & Nutrition Industry Report, 2012)

#### 2. 투자 계획

항목		(2019년) 개발 종료 후 1년	(2020년) 개발 종료 후 2년	(2021년) 개발 종료 후 3년
매출원가 (백만원)		100	120	200
판매관리비 (백만원)		100	100	150
자본적 지출	토지	-	-	-
	건물/건축물	-	-	-
	기계장치등	-	-	-
자본적지출 합계		200	220	350

### 제 2 절. 기술확산 계획

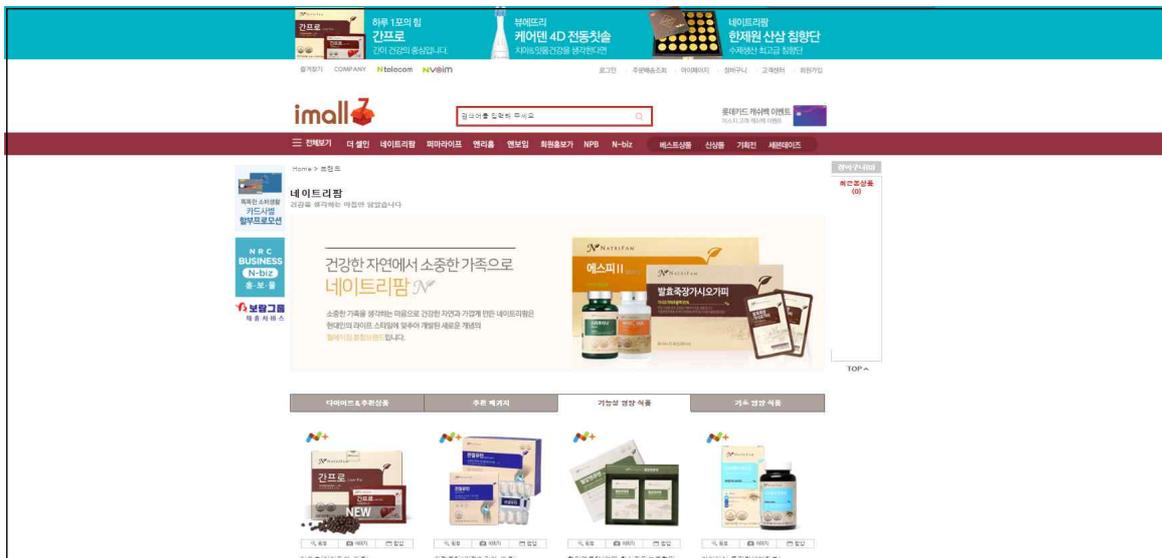
#### 1. 시장진입/마케팅 계획

년 도	구 분	추진계획
2019	브랜드 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>제품 인지도 확보 및 브랜드 구축작업</li> <li>2019년부터 적극적인 홍보 시작 (개발 진행 사항 및 시장진입일정 등)</li> </ul>
	전시회 참가	<ul style="list-style-type: none"> <li>국내외 전시회 참가</li> <li>- 국내 : 농수산식품박람회, 국제건강산업박람회 등</li> <li>- 국외 : VITAFOODS, FOODEX, FOOD ASIA</li> </ul>
	공급.유통 채널 확보를	<ul style="list-style-type: none"> <li>중소기업청의 해외 마케팅 지원사업, 해외규격 인증사업 등을 활용한 판로 확보</li> </ul>

	<p>통한 판로 개척</p> <p>판매 전략</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 당사 보유의 해외 네트워크를 활용한 해외 파트너 확보</li> <li>• 천연 솔잎착즙액 분말이라는 점을 강조하여 당사의 강점을 부각한 판매전략 기술 (품질의 우수성)</li> <li>• 제품의 과학적 DATA를 확보하여 동일 발효제품 대비 경쟁력 확보</li> </ul>
2020	<p>2019년 활동 계속 연계</p> <p>On/Off</p> <p>홍보 활동</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 전문세미나 개최를 통한 제품 우수성 제시</li> <li>• 신문 및 방송을 통한 홍보 활동 진행</li> </ul>

## 2. 판매 계획

### 가. 인터넷 쇼핑몰 및 방문판매 진행(기존 유통망 활용)



### 나. 솔잎착즙분말원료를 활용한 다양한 제품 개발



### 다. 해외 협력업체를 통한 수출 진행

## 붙임. 참고문헌.

### 1. 마우스에서 솔잎의 항암효과 및 독성연구

### 2. Single-Dose and Seven-Day Repeated-Dose Toxicity Tests of the Ethanol Extracts from Bark of *Pinus densiflora* in Rats

### 3. Pine needle (*Pinus sylvestris*) oil

(<http://cms.herbalgram.org/commission/Monographs/Monograph0298.html>)

– 피부와 점막의 자극, 기관지 경련

### 4. Korean pine (*Pinus Koraiensis*) (<http://3rdparty.naturalstandard.com/frameset.asp>)

가. Appetite suppressant

나. Safety : Use cautiously in individuals prone to allergies, in nonallergic children, in pregnant or breastfeeding women, or in high amounts. Use cautiously in those using agents that increase the risk of bleeding, agents that lower blood pressure, or agents that lower lipid levels. Avoid with known allergy or sensitivity to Korean pine (*Pinus koraiensis*), its constituents, or members of the *Pinus* genus or *Pinaceae* family. Avoid in unsupervised children with known allergies to other nuts.

다. Possible side effects : Cross-reactivity or cross-sensitivity with other allergens, decreased lipid levels, heart attack, increased bleeding, low blood pressure, rapid-onset life-threatening allergic reactions, shock, skin blotchiness, swelling under the skin, whole-body allergic reactions.

라. Possible interactions : Agents that affect the risk of bleeding, agents that lower blood pressure, antibiotics, anticancer agents, antifungals, lipid-lowering agents, weight loss agents (such as agents similar to glucagon-like peptide-1 (GLP-1)), and herbs or supplements with similar effects.

마. Dosing

1) Adults (18 years and older) : For appetite suppression, PinnoThin™ pine nut free fatty acid (FFA) oil and PinnoThin™ pine nut triglyceride (TG) oil have been taken by mouth.

2) Children (younger than 18 years) : Not enough scientific data available.

### 5. Edible medicinal and non-medicinal plant: volume 4, fruits(297-310)

### 6. Monterey pine (*Pinus radiata*) (<http://3rdparty.naturalstandard.com/frameset.asp>)

가. Antioxidant

나. Cardiovascular health (heart and blood health)

다. Metal performance

라. Safety : Use cautiously in patients taking blood pressure-lowering agents or those with blood pressure disorders, and in patients with high blood levels of fats or cholesterol. Avoid with known allergy or hypersensitivity to Monterey pine, its components (such as pollen), airborne allergens, or members of the *Pinaceae* family. Avoid during pregnancy or breastfeeding.

마. Possible side effects : Eye irritation, increased blood levels of fats or cholesterol, lowered blood pressure, runny nose, skin reactions.

바. Possible interactions : Agents that affect blood pressure, anti-inflammatory agents, antioxidants, drugs that lower fats or cholesterol, weight loss agents, and other herbs and supplements with similar effects.

사. Dosing

1) Adults (18 years and older) : For antioxidant effects, heart health, and mental performance, Monterey pine has been taken by mouth as an Enzogenol capsule (containing Monterey pine extract and vitamin C).

2) Children (younger than 18 years) : Not enough scientific data available.

## 7. French maritime pine bark extract (*Pinus pinaster*)

(<http://3rdparty.naturalstandard.com/frameset.asp>)

가. Asthma

나. Circulation problems

다. Heart disease risk

라. Safety : French maritime pine bark extract is likely safe in doses of 150–360 milligrams daily for up to three months.

마. Caution is advised in people with diabetes or low blood sugar, and in those taking drugs, herbs, or supplements that affect blood sugar. Caution is advised in people with bleeding disorders or taking agents that may increase the risk of bleeding. Caution is advised in people taking drugs or herbs and supplements that lower blood pressure. Use caution in people with autoimmune disease, heart disorders, liver disease, and upset stomach, or those taking agents that affect the immune system. Use caution in small children. Avoid if allergic or sensitive to French maritime pine bark extract, its parts, or members of the Pinaceae family. Avoid in women during the first three months of pregnancy.

바. Possible side effects : Bad breath, changes in heart rate, changes in the immune system, changes in liver enzymes, chest pain, dizziness, headache, heart failure, increased bleeding risk, increased urination, low blood pressure, low blood sugar, nausea, skin problems (eczema, hives, and rashes), sleepiness, upset stomach.

사. Possible interactions : Aged garlic extract, agents that affect blood pressure, agents that affect blood sugar, agents that affect the immune system, agents that improve breathing, agents that increase bleeding risk, agents that treat radiation side effects, alcohol, alpha-lipoic acid, anti-androgens, antibacterials, antibiotics, anticancer agents, antifungals, antihistamines, anti-inflammatory agents, antioxidants, aspirin, beta-carotene, calcium channel blockers, central nervous system (CNS) stimulants, cholesterol-lowering agents, fertility agents, ginger, fluoride, inotropes, L-arginine, L-lysine, pain relievers, phosphodiesterase inhibitors, pinokinese, rutin, S-allylcysteine, stimulants,

vitamin C, vitamin E, and other herbs or supplements with similar effects.

o}. Dosing

- 1) Adults (18 years and older) : French maritime pine bark extract has been taken by mouth in the form of Pycnogenol capsules, tablets, and chewing gum. It has been applied to the skin in the form of a Pycnogenol cream or powder.
- 2) Children (younger than 18 years) : French maritime pine bark extract has been taken by mouth in the form of Pycnogenol.

**8. Rocky Mt Med J, 1960, 8(4), 9**

- The dangerous time for consumption of pine needle (Pinus sp.) is during the latter part of the gestation period.

**9. J Anim Sci, 70(2), 525-530**

- Consumption of Ponderosa pine needles (Pinus ponderosa) by cows during late pregnancy results in the premature delivery of viable calves.

**10. Cornell Vet. 1989 Jan;79(1):39-52.**

- Research has verified field observations that cows grazing ponderosa pine needles may abort.

**11. Can J Vet Res, 67(3), 194-197 (korean)**

- The ingestion of pine needles (Pinus koraiensis) may play a role in abortion in Korean native cows by increasing the serum 17beta-estradiol concentration and decreasing the serum progesterone concentration.

**12. J Range Manag, 1993, 46(Sep), 394-398**

- Ponderosa pine (Pinus ponderosa Lawson) needles cause abortions in pregnant cows.

**13. J Range Manag, 45(Nov), 528-533**

- Pine needles from ponderosa pine (Pinus ponderosa Lawson) consumed by cows during winter can cause abortions.

**14. Cornell Vet, 79(1), 53-60**

- Feeding pine needles to pregnant cows in late gestation causes abortions and that these abortions are directly caused by or are associated with changes in steroid metabolism.

**15. J Anim Sci, 70(2), 531-537**

- Consumption of Ponderosa pine needles by late-pregnant beef cows results in the premature delivery of a viable calf.

**16. Vet Hum Toxicol, 1998, 40(5), 260-263**

- Lodgepole pine (Pinus contorta) and common juniper (Juniperus communis) contain high levels of isocupressic acid that has been identified as the abortifacient component of ponderosa pine needles in cattle. Therefore, the abortifacient potential of P contorta and J communis needles was tested in feeding trials with pregnant cattle.

**17. Cornell Vet, 1977, 67(2), 294-299**

– Pine needle–induced abortion in cattle is a serious problem in many areas of western United States and Canada. Field observations on pine needle abortion indicate that this condition is stress related. The results of this research indicate that the pine needle–induced abortion occurs much more readily if cows are under stress.

**18. Cornell Vet, 1982, 72(2), 128–136**

– Consumption of Ponderosa pine (*Pinus ponderosa*) needles causes reproductive dysfunction in mice during early and late gestation

**19. J Anim Sci, 1992, 70(5), 1604–1608**

– Needles of the Ponderosa pine (*Pinus ponderosa*) induce premature parturition in cattle when ingested during late pregnancy, especially during the third trimester.

**20. J Am Vet Med Assoc, 1976, 169(12), 1301–1302**

– Pregnancy and lambing rates were not affected by the feeding of pine needles. An antiestrogenic effect of pine needles on the reproductive process in ewes was not clinically detectable. There was no indication of any toxic effects on ewes consuming a 37% pine needle diet

**21. J Anim Sci, 70(5), 1992, 1609–1614**

– Consumption of Ponderosa pine (*Pinus ponderosa*) needles (PN) by beef cows during late gestation results in premature delivery in association with profound constriction of the caruncular arterial bed

**22. J Agric Food Chem, 1994, 42(Mar), 756–761**

– crude acid fraction isolated from the needles of ponderosa pine (*Pinus ponderosa* Laws) induced abortions when fed to late–term pregnant beef cows. The major components identified in this abortifacient fraction were four long–chain fatty acids (palmitic, linoleic, oleic, and stearic acids), and two labdane diterpene acids (imbricataloic and isocupressic acids).

**23. Cornell Vet, 1994, 84(), 33–39**

– abortifacient compound(s) present in pine needles are most efficiently extracted by methylene chloride.

**24. 한국식품영양과학회지, 35(3), 321–327.**

– 2형 당뇨 마우스에서 솔잎 추출용액의 경구투여가 혈당조절에 미치는 영향

주 의

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