

발간등록번호

11-1543000-002755-01

국산감초와 코코넛오일 혼합 소재를 이용한 혈중중성지방 개선 개별인정형 건강기능식품 개발 최종보고서

2019. 3. 20

주관연구기관 / (주)한국생활건강

협동연구기관 / 한림대학교산학협력단

농림축산식품부

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “국산감초와 코코넛오일 혼합소제를 이용한 혈중중성지방 개선 개별인정형 건강기능식품 개발”(개발기간 : 2016. 07. ~ 2018. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 08

주관연구기관명 : ㈜한국생활건강 (대표자) 지 정 근

협동연구기관명 : 한림대학교산학협력단 (대표자) 송 창 근 (인)

주관연구책임자 : 지 정 근

협동연구책임자 1 : 임 순 성

협동연구책임자 2 : 강 영 희



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	116020-3	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)			
	세 부 과 제 명	국산감초와 코코넛오일 혼합소재를 이용한 혈중중성지방개선 개별인정형 건강기능식품 개발			
연구책임자	지정근	해당단계 참여연구원 수	총: 12명 내부: 12명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부: 160,000천원 민간: 60,000천원 계: 220,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 12명 내부: 12명 외부: 0명	총 연구개발비	정부: 530,000천원 민간: 200,000천원 계: 730,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)한국생활건강, 기업부설연구소			참여기업명:	(해당 없음)
국제공동연구	상대국명: (해당 없음)			상대국 연구기관명:	(해당 없음)
위탁연구	연구기관명: (해당 없음)			연구책임자:	(해당 없음)

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반
----------------------	----

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	6	6									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

요약) 국산감초와 코코넛오일 혼합소재를 이용한 혈중중성지방개선 개별인정형 건강기능식품 개발을 통하여 특허 출원 3건, 디자인 등록 1건, 해외상표 등록 2건을 달성하였고, 논문은 SCI급 5건과 비SCI급 1건으로 총 6건을 게재(publ.)하였으며, 현재 SCI급 1건은 심사 중에 있음. 국내외 학술대회는 한국생약학회를 포함하여 총 6건을 발표하였으며, 한림대학교산학협력단과의 기술실시(기술이전) 1건을 달성하였음. 주관기관에서 3명의 고용창출을 달성하였고, 협동기관인 한림대학교산학협력단에서 인력양성 1명을 배출하였음. 최종 개별인정 신청을 위한 임상시험을 진행 중에 있음.

보고서 면수

101Page

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>1. 연구목표 유효물질(기능성분)의 분리 및 정제와 구조 규명, 혈중지질개선 효능 검증, 바이오마커 확인 및 기전 연구, 건강기능식품 개별인정을 위한 CRO 기관 선정, 임상시험용 시제품 개발 및 제조, 혈중중성지방 개선 건강기능식품 제품개발 및 제품의 홍보, 마케팅 전략 수립하고자 함</p> <p>2. 연구내용</p> <p>(1) 국산감초와 코코넛오일의 혈중중성지방 개선 원료 개별인정 및 품목허가 확보를 통한 제품개발과 사업화</p> <p>1) 대량 생산 기술 및 생산 공정 최적화 (기능성 성분의 분리 정제 및 제조 공정 확립)</p> <p>2) 제조공정 표준화 (추출용매/온도/용매비율/시간/ 대량추출 최적화-scale-up/농축, 건조 등)</p> <p>3) 혈중중성지방 개선에 도움을 주는 건강기능성식품 개별인정 위한 CRO 기관 선정</p> <p>4) 임상시험용 시제품 개발 및 제조 (GMP시설)</p> <p>5) 임상시험을 위한 IRB 신청/승인 및 임상시험 실시(CRO의 자료 수집)</p> <p>6) 혈중중성지방 개선 건강기능식품(개별인정) 기능성원료 신청 및 승인을 위한 자료 보완/품목허가신고</p> <p>7) 혈중중성지방 개선 건강기능식품 제품개발 및 제품의 홍보, 마케팅 전략 수립</p> <p>(2) 국산감초와 코코넛오일의 혈중중성지방개선 최적비율확보와 원료의 표준화, 안정성평가 연구</p> <p>1) 코코넛오일과 국산감초비극성 추출물 확보 및 효력검증팀 (협동기관 2)과 긴밀한 협력을 통한 최적 효력비율 확보</p> <p>2) 원재료 표준화 (재배 지역/사용부위/채취시기) 확립</p> <p>3) 반응표면분석을 이용한 최적의 추출조건 확립 - 혼합 비율 도출</p> <p>4) Active-principle에 의한 유효물질(기능성분)의 분리 및 정제</p> <p>5) 분리된 화합물들의 UV, IR, mass, NMR등 구조분석기기를 이용한 구조 규명</p> <p>6) 지표성분 및 유효성분을 초점으로 원료의 안정성연구 (가속실험)</p> <p>7) 지표성분 및 유효성분을 초점으로 제품의 안정성연구 (가속실험)</p> <p>8) 지표성분 및 유효성분을 초점으로 원료 및 제품의 저장시험 및 유효기간 설정</p> <p>(3) 국산감초와 코코넛오일의 혈중중성지방개선 및 혈관기능강화 효능평가 및 기전연구</p> <p>1) 고콜레스테롤 식이 유도 고지혈증 동물실험 모델을 이용한 GUCO의 혈중지질개선 효능 검증</p>
------------------------	---

	<p>2) 고지혈증 동물 모델에서 콜레스테롤 역수송에 대한 바이오마커 확인 및 기전 연구</p> <p>3) 고지혈증 동물모델에서 GUCO의 간에서 지방합성 억제에 대한 기전 확인</p>				
연구개발성과	<p>1. 특허 출원 3건, 디자인 등록 1건, 해외상표 등록 2건</p> <p>1) 감초 추출물의 제조방법 및 이로부터 얻은 항산화 활성 조성물 (출원번호 10-2016-0164667)</p> <p>2) 코코넛오일의 상온유동성 개선방법(출원번호 10-2017-0144692)</p> <p>3) 감초 추출물 및 코코넛오일을 포함하는 복합물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 예방 또는 개선용 조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품 (출원번호 10-2018-0095979)</p> <p>4) 식품용기-GUCO 복합물 용기(디자인 등록번호 30-0977982)</p> <p>5) COCOEL 29류(상표 등록번호 US5372143)</p> <p>6) COCOEL 30류(상표 등록번호 US5366827)</p> <p>2. 논문 게재(publ.) 6건, 심사 중 1건</p> <p>- SCI급 논문 5건 및 비SCI급 논문 1건 게재</p> <p>- SCI급 논문 1건 심사 중</p> <p>3. 학술발표 6건</p> <p>4. 기술실시(기술이전) 1건, 기술료 1,100만원</p> <p>5. 고용창출 3명</p> <p>6. 인력양성 1명</p>				
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	<p>- 혈중중성지방개선 기능성 및 작용기전 연구를 통한 건강기능식품 사업화 기반 마련</p> <p>- 국산감초를 사용하여 지역 농가에 고소득 작물로서 활성화와 소득증대</p>				
국문핵심어 (5개 이내)	감초추출물	코코넛 오일	혈중중성지방	심혈관질환	건강기능성식품
영문핵심어 (5개 이내)	Glycyrrhiza uralensis	Coconut Oil	blood triglyceride	cardiovascular disease	functional foods

<Summary>

Purpose & Results	<p>1. Purpose</p> <ul style="list-style-type: none">- Identifying blood lipid-lowering effects of Coconut oil in combination with Licorice extracts(named GUCO)- Establishing the optimal conditions for GUCO-complex and to testing in animal and clinical trial- Registering the GUCO-complex in Health Functional Food(HFF) Material- Commercializing the GUCO-complex and establishing a marketing strategy. <p>2. Results</p> <p>(1) Development and commercialization of GUCO-complex product, individually recognized by the government</p> <ol style="list-style-type: none">1) Optimizing mass produced-technology & process2) Setting up standard manufacturing process3) Selecting a CRO agency for clinical trials4) Manufacturing prototype of GUCO-complex5) Obtaining IRB permission / and then conducting clinical trials6) Responding to KFDA' s request of complementary review data for HFF approval and Reporting item permission7) Commercializing GUCO-complex and establishing a marketing strategy <p>(2) Determination of optimum blending ratio of Coconut oil in combination with Licorice extracts</p> <ol style="list-style-type: none">1) Securing Coconut oil (non-polar) and Licorice extract and then determining optimum blending ratio of Coconut oil in combination with Licorice extracts2) Defining origin of raw materials (cultivation region/ part used/ harvest time)3) RSM(response surface methodology) analysis4) HSCCC(high-performance countercurrent chromatography) Separation5) Analytical chemistry study6) Stability study - GUCO materials7) Stability study - GUCO-complex (prototype)8) Storage test and expiry date determination <p>(3) Identification of blood lipid-lowering effects of Coconut oil in combination with Licorice extracts, mechanism research</p> <ol style="list-style-type: none">1) Identifying blood lipid-lowering effects of MCT(Medium-Chain)-Enriched Coconut oil in combination with Licorice extracts in experimental hyperlipidemia mice.
----------------------	---

	<p>2) Molecular mechanism study on reverse cholesterol transportation</p> <p>3) Molecular mechanism study on steatosis hepatis</p>				
Achievement	<p>1. Registered 3 patents, 1 design, 2 Foreign trademarks</p> <p>1) Application Number 10-2016-0164667</p> <p>2) Application Number 10-2017-0144692</p> <p>3) Application Number 10-2018-0095979</p> <p>4) Food container (Design registration number 30-0977982)</p> <p>5) COCOEL 29Cl(Trademark registration number US5372143)</p> <p>6) COCOEL 30Cl(trademark registration US5366827)</p> <p>2. Published 6 papers(SCI-5/KCI-1), Submitted 1 paper</p> <p>3. Presented 6 posters</p> <p>4. 1 technology transfer, Royalty ₩11,000,000</p> <p>5. Hiring 3 people</p> <p>6. Graduated 1 students(ph.D)</p>				
Application plan	<p>- Being to set a stable base that commercialize GUCO-complex in a Health Functional Food Markets, a field of “Maintenance of Healthy Blood Triglyceride Levels” .</p> <p>- Being to expect a rise in domestic farm income through higher-valued crops, Korea licorice.</p>				
English keyword	Glycyrrhiza uralensis	Coconut Oil	blood triglyceride	cardiovascular disease	functional foods

< CONTENTS >

1. Summary of Research	9
2. Contents and Results	15
3. Achievements and Contributions to related area	93
4. Application Plans for Research, etc.	100
Encl. References	101

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	9
2. 연구수행 내용 및 결과	15
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	93
4. 연구결과의 활용 계획 등	100
붙임. 참고 문헌	101

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

지방의 과다섭취는 비만증 유발과 고혈압, 당뇨, 동맥경화증 등과 같은 심혈관질환 위험 인자의 유병률을 증가시키는 원인이 있음. 전 세계적으로 심혈관 질환은 사망원인 1위이며 우리나라의 경우 악성 종양 다음으로 높은 순위를 차지하고 있음.

콜레스테롤과 중성지방은 심혈관질환의 중요한 위험인자로서 콜레스테롤 이외에 식후 중성지방 농도가 심혈관질환 예측에 밀접한 관련이 있음. 식후 중성지방의 위험성에 대하여 조사한 결과, 식후 중성지방 수치가 높은 경우에 심혈관질환 발생 및 사망률은 1.3~3.3배 높은 것으로 나타남. 이러한 심혈관질환은 치료보다 예방이 중요한 질환으로 여겨져 이를 위한 식이조절 및 식품의 기능성 탐구가 강조되고 있음.

한국식품연구원의 선행연구에 따르면 감초추출물은 간 및 혈중 지질 개선, 인슐린 저항성 회복 등의 긍정적인 효능을 보였으며 개발된 제형의 안전성 또한 확인되었으므로 코코넛오일과 혼합하여 섭취할 경우, 혈중 중성지질 개선에서 시너지 효과가 있을 것으로 기대됨.

코코넛오일은 92%가 포화지방산으로 이루어져 있으며, 자연 오일 중 포화도가 가장 높은 지방임. 포화지방산은 혈관을 타고 돌아 혈관에 흡착돼 각종 성인병의 원인이 되지만, 코코넛오일의 포화 지방산의 구조가 동물성 지방산과는 다른 중사슬지방산의 구조를 가지고 있음. 중사슬지방산은 체내에서 분해가 잘 돼 혈관에 쌓이지 않고, 인체의 기초대사율을 높여준다고 알려져 있음. 코코넛오일은 자연에서 온 항생제라고 불리우며, 코코넛오일 성분 중 50% 이상이 라우르산(Lauric acid)이라는 모유에 다량 함유된 면역성분임. 또한, 코코넛오일에 풍부한 중사슬지방산은 에너지 소비를 촉진시키고, 신진대사를 높여 체중감소 효과를 나타냄 (2016.04.07. 헤럴드경제).

국내에서는 코코넛오일에 대한 기초적인 연구 미비로 인해 생리활성이나 기능성의 지표가 되는 바이오 마커조차 개발되어 있지 않고 있는 실정임. 이처럼 코코넛오일을 활용한 식품 및 의약품 소재, 기능성식품으로 개발하기 위해서는 원료의 연구개발, 제조 및 생산, 마케팅 전략을 종합적으로 연계하여 구축할 필요가 있음. 코코넛오일로부터 유효성분을 추출, 농축, 정제, 분리하는 기술의 확립이 필요하며 분리된 유효성분을 정성, 정량적으로 분석하고, 그 구조를 알아내어 약리작용과의 상관관계 분석 및 활성물질의 탐색 연구를 통해 유용성을 확대해 나아가 할 것임.

따라서 본 연구에서는 혈중중성지방 개선 효능이 있을 것으로 판단되는 코코넛오일과 국산 감초인 *Glycyrrhiza uralensis* 를 대상으로 혈중중성지방을 낮추는 코코넛오일과 국산감초의 혼합 비율이 최적화된 추출물(GUCO)의 표준화 및 안정성이 확인된 기준규격을 설정하고, GUCO의 전임상 효능평가(in vitro, in vivo) 및 임상시험 효력평가를 통하여 심혈관질환의 원인으로 알려진 혈중중성지방 개선의 건강기능식품 개별인정 원료 및 품목허가의 제품을 개발하는 것임.

1-2. 연구개발의 필요성

인구 노령화와 의료비 자기 부담의 증가에 따라 전 세계적으로 인구의 고령화로 인하여 의료비의 자기 부담이 증가함에 따라 국가 부담 가중, 소비자의 ‘Self Care 의식’ 이 증대되면서 건강식 및 기능성 식품의 시장이 빠르게 성장하고 있음.

또한, 질병 예방을 통한 삶의 질 향상에 대한 관심 고조로 현대에서는 질병의 치료보다는 예방에 대한 중요성이 강조되고 있음. 특히, 혈중 중성지방 개선에 관한 심각성에 비해 뚜렷한 치료법이 없으므로 건강기능식품을 포함한 예방 차원 및 혈중 중성지방 개선에 대한 관심이 높아짐.

혈중 중성지방은 혈관건강에 나쁜 콜레스테롤(LDL-콜레스테롤)의 생성을 돕고, 좋은 콜레스테롤(HDL-콜레스테롤)의 분해를 촉진하므로, 혈중 중성지방 수치가 높아지면 동맥경화에 위험이 높아지고, 혈중 중성지방의 수치가 높으면 심장병·뇌졸중 등 혈관질환이 발생률이 높아짐. 고콜레스테롤혈증, 특히 LDL-콜레스테롤이 높은 경우에 심혈관질환의 위험이 증가하게 됨.

이에 따라, 혈중 중성지방 개선에 관한 요구와 관심이 높아지고 있으며, 혈중 중성지방 개선은 치료보다는 예방이 중요한 질환으로 인식되어져 예방책에 대한 소비자의 요구가 증가될 것으로 예상됨.

현재 생활수준의 향상으로 인하여 식생활이 서구화되고 평균수명이 연장되고 있으며, 질병의 양상이 선진국형으로 변모하고 있음. 서구화된 식습관의 변화는 우리나라의 주식인 쌀에서 육류 위주의 식습관으로 변화하여 기름진 동물성 지방의 섭취로 인해 콜레스테롤을 과다 섭취함으로써 고콜레스테롤혈증 유병율이 점차 증가하는 추세임.

심장마비, 동맥경화, 뇌졸중 등과 같은 순환기 질환은 만성 성인병으로서 의학이 발달하고 수많은 치료제가 계속 나오고 있음에도 불구하고 유병율은 계속 증가하고 있는 추세임.

통계청에서 발표한 2014년 사망원인 순위 조사에서 10대 사망원인 (총 사망자의 70.5%를 차지)에서 상위 3대 사망원인(암, 심장 질환, 뇌혈관 질환)은 전체의 47.7%로 전년보다 0.3%p 증가함 (‘13년 47.4%). 10년 전에 비해 사망원인 순위가 상승한 사인은 심장 질환(3위→2위), 고의적 자해(5위→4위), 폐렴(10위→5위)이고, 하락한 사인은 뇌혈관 질환(2위→3위), 당뇨병(4위→6위), 간 질환(6위→8위), 운수 사고(8위→9위), 고혈압성 질환(9위→10위)임.

따라서 고콜레스테롤혈증을 억제하고, 경화성 혈관질환을 억제하는 효능을 가지는 기능성식품 개발은 사회·문화적 측면에서 막대한 영향을 미칠 것으로 많은 사료되며, 본 기술개발을 통한 혈중중성지방 개선 건강기능식품의 개발은 반드시 필요한 것임.

1-3. 연구개발 범위

구분	연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
1차년도	대량 생산 기술 및 생산 공정 최적화	실험실내 추출 scale과 대량생산을 위한 추출 scale을 환산 및 지표 및 기능물질의 측정을 통해 대량 생산 시설에서의 추출수율 최적화 반복 예비 추출을 통해 오차 범위 최소화	-대량추출전문가를 활용하여 실험실내 추출 scale과 대량생산을 위한 추출 scale을 환산과 지표 및 기능물질 측정을 통해 대량 생산시설에서의 추출수율 최적화 반복 예비 추출을 통해 오차 범위 최소화함.
	제조공정 표준화	추출용매/온도/용매비율/시간/대량추출 최적화-scale-up/농축, 건조 등	-코코넛오일 중 소비자 기호도와 경제적인 측면에서 Organic RBD 코코넛오일 원료로 제품개발하기로 결정. -대량생산에 맞게 추출용매 비율, 시간, 온도 등 제조공정을 표준화함.
	혈중중성지방 개선 건강기능식품 제품개발 및 제품의 홍보, 마케팅 전략 수립	on-line, off-line 매장을 활용한 마케팅 전략 수립	-주원료인 코코넛오일의 on-line, off-line 및 박람회 등을 통한 지속적인 홍보 -연구를 통해서 얻어진 논문, 특허(지식재산권 확보)를 활용하여 매스컴을 통한 혈중중성지방 개선 효능 홍보 계획입
	원재료 안전성 근거 확보	국내 관련 규정 검토 전통적 사용기록 조사	-안전성 근거자료로 활용
	코코넛오일과 국산감초비극성 추출물 확보 및 최적 효력비율 확보	감초에탄올추출물, 코코넛오일을 용매로 사용하여 용출된 감초추출물, 감초에탄올추출물의 코코넛오일 추출물 확보 및 HPLC 패턴 분석, 수율과 용해도 비교 분석	-감초에탄올추출물, 코코넛오일을 용매로 사용하여 용출한 감초 추출물, 감초에탄올추출물의 코코넛오일 추출물의 HPLC 패턴 분석 결과 동일한 성분이 추출되는 것으로 확인 -감초에탄올추출물의 코코넛오일 추출물은 용해도 상태가 좋지 않음을 확인함. 따라서 코코넛오일을 용매로 사용하여 용출한 감초 추출물로 선정함.(비극성 추출물)
	원료의 지표성분 분리	SiO ₂ column, MPLC 분리 시도	-영주감초 비극성추출물을 확보, 감초의 지표성분 3개 분리 및 구조 규명(영주감초의 지표성분 Dihydroglyasperin C, Dihydroglyasperin D, Isoangustone A)
	원재료 표준화	지역별, 유효 활성(항산화) 검색	-식물종 및 재배지역 : 경북 영주 -사용 재배 년수는 1~2년생으로 채취 시기는 11월로 결정
	반응표면분석을 이용한 최적의 추출조건 확립 -	시료와 추출용매 비율 (100-600 mg/mL), 추출 온도 (40-60°C), 추출시간	-예측 된 정상점은 안장점(Saddle point)으로 확인되었고, 수율 3.56%, 전체 비극성 추출(면적) 10,669(AUC),

	혼합 비율 도출	(2-12hr)으로 반응표면분석법 실험 계획 - 비극성 물질 함량, 수율, 항산화능	항산화 작용 89.1%의 우수한 감초추출물을 얻기 위해서는 코코넛오일에 감초의 비율을 415~503 mg/mL, 추출 온도 61.3~86 °C, 추출 시간 6.6~9.3 시간으로 추출 조건이 확보됨. -반응표면분석으로 나온 조건의 최대 로 얻을 수 있는 예상치 수준과 실제치 수준이 비슷함을 확인함.
	고지방식이로 유도된 고지혈증 동물모델 확립	oil성분으로서 in vitro에서의 처리가 어려움으로 in vivo study에서 확인. in vivo study에서 사용한 mouse model은 C57BL6/J mouse로서 60% high-fat diet를 8주간 제공하면 자연스럽게 이상지질혈증이 유발되는 대표적인 실험동물모델로서 알려짐. 즉, 본 연구에서는 해당 reference의 연구방법을 발췌하여 8주간 실험을 진행함.	-Christian Weber, et al., Nature Reviews Immunology, 2008의 reference를 참고하여 C57BL6/J mice에 60% high-fat diet를 8주간 제공함으로써 이상지질혈증 유발 실험동물모델을 구축함.
	코코넛오일과 국산감초비극성 추출물의 최적 효력비율 확보	고지방식이로 이상지질혈증을 유도한 실험동물에 1협동기관에서 제공받은 다양한 추출방식에 근거한 다양한 최적비율의 dose를 2-3회/1주 간격으로 실험동물에 위내투여하여 최종 8주에 동물의 혈액에서 효능이 있는 최적비율의 추출물을 선정함.	-1협동기관에서 추출한 두가지 방식인 1)감초를 코코넛오일에 용출시킨 dose (300, 600 mg/ml), 2)감초비극성추출물을 코코넛오일에 녹인 dose (3, 1.5 mg/ml)을 0.1ml/1회에 한하여 2-3회/1주 간격으로 동물에게 위내투여하여 이상지질혈증을 개선하는지 효능을 확인함.
2017	혈중중성지방 개선에 도움을 주는 건강기능성식품 개별인정 위한 CRO 기관 선정	개별인정 위한 CRO 기관 선정	-CRO 기관으로 바이오푸드씨알오를 선정하고, 인체적용연구를 진행함
	임상시험용 시제품 개발 및 제조 (GMP시설)	코코넛 오일에 감초추출분말을 균일하게 넣기 위한 방법으로 캡슐 제조 가능한지 테스트	-감초추출분말 제조, 코코넛오일은 일반 코코넛오일 굳는 현상으로 코코넛 MCT오일로 결정 -감초추출분말과 코코넛오일의 조제물 테스트 완료
	혈중중성지방 개선 건강기능성식품 제품개발 및 제품의 홍보, 마케팅 전략 수립	용기, 단상자, 라벨 등 시제품 개발 진행	용기, 단상자, 라벨 등 시제품 개발 진행

<p>유효물질(기능성분)의 분리, 정제 및 구조 규명</p>	<p>HSCCC를 이용한 분리 및 open column을 이용하여 분리 실시</p>	<p>-감초 추출물을 확보하기 위하여 Hex:EtOH=9:1추출하여 SiO₂ column으로 분리하였고, 이동상 용매로는 헥산(Hexan) : ethyl acetate 비율을 달리하여 실시함. HSCCC는 분배계수에 따른 적합한 용매 시스템 {Hexane - Ethyl acetate-Methanol-water (6.5 : 6.5 : 6 : 4, v/v/v/v)}을 선별하여 실시함. ¹H-, ¹³C-NMR, ¹H-¹H COSY, DEPT, HBQC, HMBC spectroscopic data로부터 구조 규명함.</p>
<p>코코넛오일과 국산감초 추출물 확보 및 최적 효력비율 확보</p>	<p>영주 감초의 년생별 glycyrrhizin 함량 측정 및 3T3-L1을 이용한 항비만 효능평가를 통한 추출 용매 %와 비율 확보</p>	<p>-추출 조건으로는 코코넛오일을 용매로 하여 추출하였지만, 대량 공정 과정의 어려움이 있어, 추출조건을 변경함. -영주 감초의 년생별 glycyrrhizin 함량 측정함. -감초 추출물을 코코넛오일에 넣는 방법으로 진행하고, 이에 따른 감초추출물의 3T3-L1을 이용한 항비만 효능평가를 실시하여 지질 축적 억제능 확인한 결과 감초 물추출물로 선정함. -코코넛오일을 용매로 사용하여 용출한 감초 추출물(비극성 추출물)에서 물추출로 최종 선정됨.</p>
<p>기준규격 지표성분 선정</p>	<p>기준규격 지표성분 선정 및 기준규격 선정에 따른 예비 시험</p>	<p>-감초 지표성분인 glycyrrhizin과 liquiritin으로 선정(감초 물추출물), 코코넛오일 Caprylic acid 선정함. -코코넛 오일에 함유된 감초 물추출물(제품용 원료 복합물)의 글리시리진과 리퀴리틴 함량 분석 예비 시험함.</p>
<p>고지방식이 유도 고지혈증 동물실험 모델을 이용한 GUCO의 혈중지질 개선 효능 검증</p>	<p>C57BL/6J 마우스를 10주 동안 45% High-fat diet 제공을 통한 GUCO를 섭취함으로써 이상지질혈증 개선 검증</p>	<p>-45% high-fat diet를 제공한 실험동물군 보다 GUCO를 섭취한 실험 동물군에서 혈중 지질개선 마커가 개선된 것을 확인함.</p>
<p>고지혈증 동물 모델에서 콜레스테롤 역수송에 대한 바이오마커 확인 및 기전 연구</p>	<p>고지방 식이로 유도한 고지혈증 실험동물에서 간을 적출하여, 간 조직을 lysis buffer에 homogenization하여 각 조직의 샘플을 확보하고, western blot assay를 통해 대표적인 마커 확인</p>	<p>-적출한 간 조직을 homogenization하여 조직의 샘플을 확보하여 지방간 유무 및 지질 개선 마커 측정</p>
<p>고지혈증 동물모델에서</p>	<p>C57BL/6J 마우스를 45% High-fat diet로 유도한 고지</p>	<p>-복강 내 대식세포를 채취하여 lysis buffer로 단백질 분석</p>

	대식세포 분리하여 지방대사에 대한 바이오마커 확인	혈중 동물모델의 복강에 3ml의 thioglycollate medium를 주사하고 3일 후에 마우스를 마취한 후 복강에서 10ml의 PBS를 주입하여 원심분리(3000 rpm, 10분)하여 세포를 채취		
2018	혈중중성지방개선 IRB서류 준비 및 임상시험 실시	혈중중성지방개선 기능성 평가를 위한 인체적용시험 IRB 심의, 인체적용시험용 시험식품 및 대조식품 제조, 감초추출물/코코넛오일 시제품 개발	인하대학교병원을 통한 인체적용시험 IRB 심의 완료, 임상시험 실시, 인체적용시험용 시험식품 및 대조식품 제조 완료, 성분 분석 및 유해물질 기준 규격 설정을 위한 공인시험 분석 실시함	
	GUCO 복합물 개별인정 자료 준비 및 제품 홍보, 마케팅 전략 수립	GUCO 복합물 개별인정 자료로 IB 자료 준비, 자체적으로 제품 홍보, 마케팅 전략 수립	GUCO복합물 개별인정 자료로 IB 자료 준비, 식약처 사전검토 실시함, 자사 고시형 건기식 홍보 및 마케팅 방식 활용하고자 함	
	기준규격 설정	코코넛오일, 감초물추출물, 캡슐의 지표성분 함량		-코코넛 오일에 함유된 caprylic acid는 389.63 mg/g으로 확인됨. -감초 추출물에 함유된 liquiritin의 함량은 12.64 mg/g으로 glycyrrhizin의 함량은 38.13 mg/g으로 확인됨. -생산된 제품(캡슐)에 함유된 caprylic acid는 159.15 mg으로 확인됨. 생산된 제품(캡슐)에 함유된 liquiritin의 함량은 0.53 mg으로 glycyrrhizin의 함량은 1.64 mg으로 확인됨.
		감초+코코넛오일을 혼합한 캡슐형 제품의 기준규격		-캡슐형 제품의 caprylic acid의 기준규격은 127.32 ~ 190.98 mg/capsule로 확인되었고, liquiritin의 기준규격은 0.42 ~ 0.63 mg/capsule이고, glycyrrhizin의 기준규격은 1.31 ~ 1.96 mg/capsule로 확인됨.
	안정성연구	감초+코코넛 오일 복합물(GUCO 복합물), 캡슐의 가속시험 및 유통기한 산출		-감초+코코넛 오일 복합물(GUCO 복합물)의 유통기한 산출 결과 caprylic acid는 24개월 glycyrrhizin의 경우 23개월 liquiritin의 경우 26개월로 나타남. -캡슐의 유통기한 산출 결과 caprylic acid는 30개월 glycyrrhizin의 경우 32개월 liquiritin의 경우 30개월로 나타남.
캡슐의 장기보존시험			-실온(20℃ 고정)에서 12개월 보관된 캡슐의 caprylic acid의 함량은 150.21 mg/capsule, glycyrrhizin의 함량은 1.45 mg/capsule, liquiritin의 함량은 0.42 mg/capsule 로 모두 기준규격 범위 내에 있는 것으로 확인됨.	

2. 연구수행 내용 및 결과

가. 국산감초와 코코넛오일의 혈중중성지방 개선 원료 개별인정 및 품목허가 확보를 통한 제품개발과 사업화[주관기관]

(1) 대량 생산 기술 및 생산 공정 최적화

감초에탄올추출물을 분말화하여 코코넛오일에 분산시키는 방법으로 대량 생산할 계획을 수립하면서, 추출업체와 제형생산을 위해 업체별로 검토함.

GMP 업체명	추출가능여부	사유	해결책
디에이치바이오	불가능	A: 오일 추출시에 MCT오일의 특성상 가수분해 잘되고 산패 빠르게 진행 B: 주정추출시에 방폭장치가 있어야 하고 방폭장치가 없는 업체가 많으며 주정바울이 높을 때 비용 많이 발생	-50%주정 추출하여 분말하여 제조한 후 오일에 분산시켜 건기식 제조
한국씨엔에스팜	불가능	A: 오일 추출 불가함, 추출 후 고형분 및 색상의 평준화 어려움 B: 100%주정은 위험	
한미양행	불가능	A: 오일 추출 시 약재가 뭉쳐 추출이 제대로 안됨. B: 100%주정은 위험	-50%주정 추출은 시도할 수 있음 -추출물을 분말화하여 오일에 분산시켜 건기식 제조 -분말 분산 위해 부형제 필요
극동에치팜	불가능	A: 오일 추출시 고른 배합 어려움, 약재를 더하여 오일 추출 시 유지의 저장 산패등의 원인으로 가수분해를 일으켜 산가 높아지게 됨. 배관 통과시 막힘 현상 B: 100%주정은 위험	
한풍네이처팜	불가능	추출시설 없음. 불가능	
<p>그 외 불가능 답변 업체 다수 - 엘에스생명과학, 에스케이네추럴팜, 다정, 푸디팜, 이수바이오, 뉴트라젠, 중앙타프라, 성신비에스티, 그린바이오 - A: 오일 추출 불가함, B: 100%주정은 위험으로 동일함</p>			

- A: 감초의 코코넛오일 추출
- B: 감초의 100% ETOH 추출 후 코코넛오일 혼합

(2) 제조공정 표준화

제조공정표준화를 위해 건강기능식품 OEM 업체 자문을 받았고, 협동기관과의 기능성원료 표준화 내용을 협의하여 기능성성분 표준화 완료 후 대량 생산업체를 선정 및 온도, 용매비율, 시간, 등 대량추출 최적화-scale-up하고 농축, 건조 등 표준화함.

(3) 혈중중성지방 개선 건강기능식품 제품개발 및 제품의 홍보, 마케팅 전략 수립

코코넛오일 관련 2016 박람회를 통해 코코넛 오일을 홍보하였고, 홈쇼핑 및 온오프라인 매장 홍보를 통해서 얻어진 논문, 특허를 활용하여 마케팅 자료를 확보함.

- 행사명: 2016G-FAIR KOREA(대한민국 우수상품 전시회)
- 개최기간: 2016.10.26.~2016.10.29 / 개최장소: 킨텍스(일산)
- 전시구성: 코코넛오일 / 활동사항: 코코넛오일 요리 시연 행사, 판매



(4) 임상시험용 시제품 개발 및 제조 (GMP시설)

□ 감초추출분말의 제조((주)대호양행)

○ 원재료

- 원재료명(이용부위) : 건조 감초(뿌리), 1~2년생
- 원산지(재배자) : 경북 영주(한림농원/김용호)

○ 제조공정 및 수율

제 공 정	공정, 식품, 식품첨가물	수 율
원재료	건조 감초 뿌리	3 kg
↓		
추출	15배수 121℃, 8시간 추출 (2회 추출)	
↓		
여과	부직포	
↓		
농축	35~40brix	4,830g
↓		
건조	분무건조	700.4
↓		
분쇄	미분쇄기	
↓		
원료	감초농축액분말	건조수율: 52.26%

- 감초추출 분말 건조수율 23.35% 나옴.

□ MCT 오일

- 기존 코코넛오일의 중사슬지방산 함유량을 늘린 것으로, 상온에서는 액체 상태로 존재함
- MCT 코코넛오일에는 카프릴산, 라우르산, 카프릭산 등의 중사슬 지방이 다량 함유되어 있음
- 중사슬 지방은 체내에 축적되지 않고 빠르게 에너지화되는 짧은 지방 사슬로 보통 탄소 수가 8개에서 10정도로 구성됨
- 일반 코코넛오일에는 중사슬 지방산이 약 55%, MCT코코넛 오일에는 중사슬 지방산이 75% 이상 함유되어 있음
- 캡슐 제조에 있어 일반 코코넛오일은 저온에서 굳어서 생산 시 어려움이 있고, 일반 코코넛오일 보다 빠르게 에너지화 되는 MCT오일이 적합하다고 판단하여 코코넛오일 원

료로 변경하였음

- 또한 MCT오일은 특수의료용도식품으로 열량 및 영양공급용 의료용도식품으로 판매되고 있는 실정임
- MCT 코코넛 오일의 원활한 원료 수급을 위해 필리핀 현장 방문하여 검토하였으며 원료업체와 계약을 체결하여 지속적으로 대량 확보가 가능함

제품명	이미지	용도	식품의유형	판매원
메디푸드 MCT오일		열량보충제	특수의료용도식품	(주)한국메디칼푸드

□ 식용유 형태 적용 적합성 검토

- 식용유 형태로 제조하기 위해 유화제를 넣어 복합물 제조 테스트를 하였으나 용매가 서로 분리되어 복합물 제조가 되지 않음.

□ 연질캡슐 적용 적합성 검토

- 1) 코코넛오일, 감초 성분 체지방 감소 기능성 시장 조사

제품명	Kaneka Glavonoid Riched Oil™	Purely Inspired 100% Pure Coconut Oil, 80 Count
제품 이미지		
제형	연질캡슐	연질캡슐
유효성분	Glavonoid(감초의 Flavonoid oil)	코코넛오일 그린커피추출물 (45% chlorogenic acid)

- 해외 체지방 감소 관련하여 감초 또는 그린커피빈추출물과 MCT오일 혼합한 건강기능식품이 있는 것을 확인할 수 있었으며 시제품 제조에 있어 MCT오일을 이용하여 연질캡슐로 제조하기로 결정함.

2) 내용물 테스트

○ 원료 물성 검토 결과

원료명	입자도	B/A 코코넛MCT오일+3 %대두레시틴	S/G	M/G	수분 (KETT)	비고
감초추출분말	97.1%	1.736	1.049	42.33	2.59%	미통과분 분쇄 가능

○ 내용물 조제테스트 검사 결과

내용물 성분 배합비					
원료명	배합비	캡슐당 기준량		비고	
감초추출분말	9.0%	45 mg		감초추출분말과 코코넛 MCT 오일의 배합비 율을 약 1:9 처 방	
코코넛MCT오일	79.0%	395 mg			
부형제	12.0%	60 mg			
합계	100.0%	500 mg			
내용물 물성 검토 결과					
내용물종류	수분 (KETT)	점도	비중	pH	부피
감초추출분말	0.34%	269.3CPS	0.944	5.15	0.529 (8.59 Minims)

- 원료에 대한 물성 검토 결과 감초추출분말은 특이사항이 나타나지 않았음
- 코코넛오일에 있어 버진 코코넛오일의 경우, 저온에서 경화되는 성질로 인해 내용물 조제 시 적절한 유동성 및 흐름성을 확보하기 어렵고 연질캡슐로 성형 시 온도변화에 따른 층 분리에 의해 내용물 함량 편차가 발생할 가능성이 높으며, 제품 건조 진행시 내용물 경화현상에 의한 캡슐 외형 변형 가능성이 있어 연질캡슐로 적용에 부적합하였음
- 경화되지 않는 코코넛오일인 MCT오일에 감초추출분말을 적용하여 조제한 내용물은 테스트 결과 연질캡슐로의 적용에 적합하였음

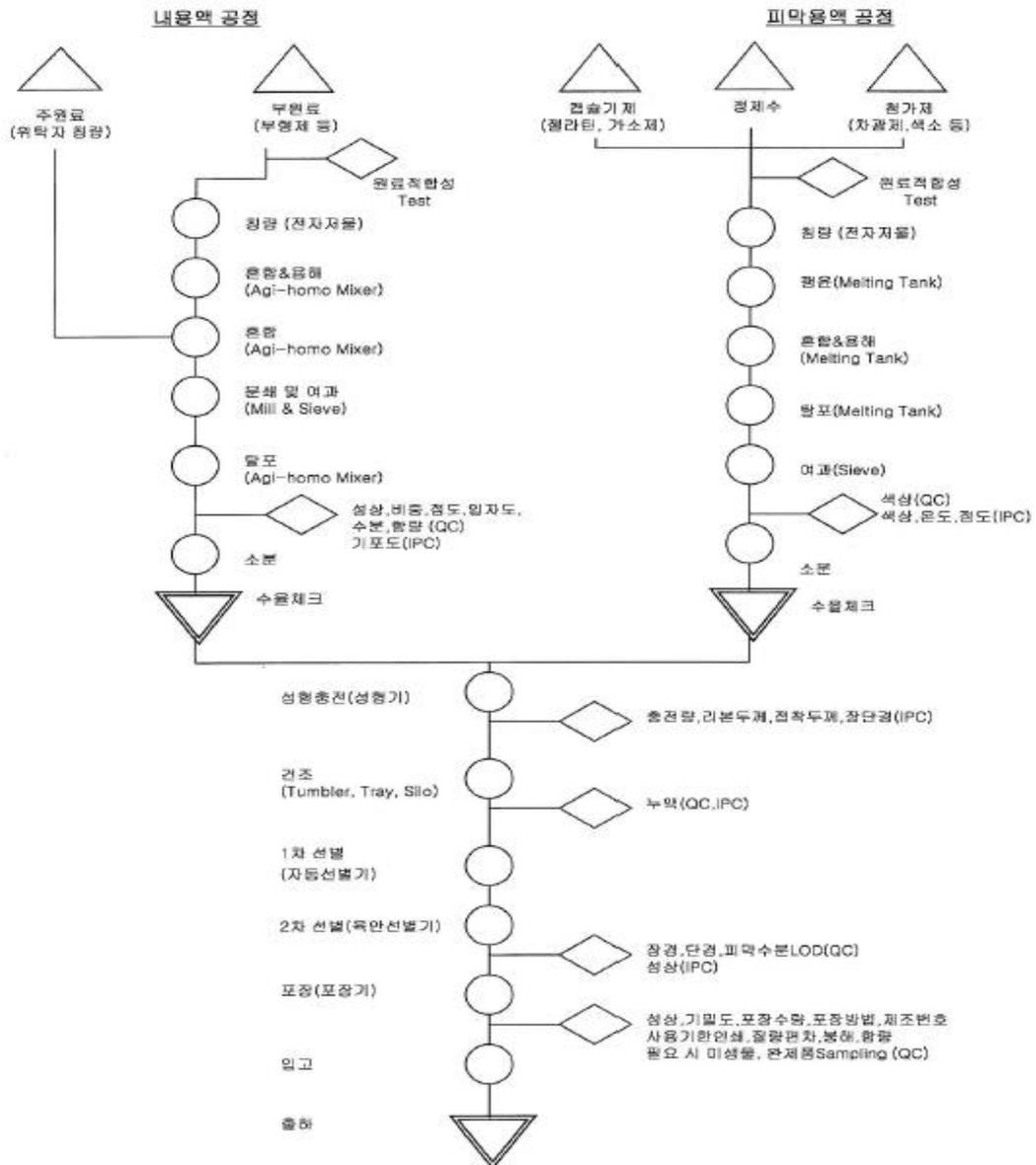


>> 테스트 조제 복합물(코코넛오일에 감초추출분말이 혼합되어 있는 상태)

□ 인체적용시험용 시제품 개발 및 제조 (GMP시설)

- GMP업체인 (주)서홍과 계약을 체결하여 인체적용시험용 시험식품, 대조식품을 제조함.

Soft capsule flow chart



<그림> 연질 캡슐 제조공정도

<표> 인체적용시험용 대조식품, 시험식품

구분	대조식품		시험식품	
주성분				
제형	캡슐			
중량	715mg (내용물 500mg, 캡슐기제 215mg)		715mg (내용물 500mg, 캡슐기제 215mg)	
구성원료	내용물: 대두유		내용물: 감초추출분말, 코코넛 MCT오일, 밀납, 대두레시틴	
	캡슐피막: 젤라틴, 글리세린, D-소비톨액, 카카오색소		캡슐피막: 젤라틴, 글리세린, D-소비톨액, 카카오색소	
보관방법	상온보관(유통기한 2년)			
섭취방법	1일 2회, 1회 2캡슐을 충분한 물과 함께 섭취			

□ GUCO 복합물의 공인시험 실시

- 유해물질 기준 규격 설정을 위하여 한국기능식품연구원에서 중금속, 대장균군, 잔류농약 (58종)에 대한 공인시험 실시, 시험·검사성적서를 발급받았음

중금속 시험·검사성적서	대장균군 시험·검사성적서	잔류농약 시험·검사성적서																																																																																																																																										
<p>제 D2018041828 호 문자확인</p> <p align="center">시험·검사성적서</p> <table border="1"> <tr> <td>제품명</td> <td>GUCO</td> <td>제조일자 (유통기한)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>제조원</td> <td>한국생활건강 감초추출물 연질캡슐 (대조군 샘플)</td> <td>장 방</td> <td>시험관</td> </tr> <tr> <td>제조번호</td> <td>제조번호: 2018-04-18</td> <td>제조번호</td> <td>제조번호</td> </tr> <tr> <td>검사번호</td> <td>제조번호: 2018041828</td> <td>제조번호</td> <td>제조번호</td> </tr> </table> <p>본 시험은 유해물질 시험·검사성적서 발급을 위하여 실시되었습니다. 시험·검사 방법: 2018-04-18 시험·검사 일자: 2018년 4월 19일 검사기관: 한국기능식품연구원</p> <table border="1"> <tr> <th>시험·검사 항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사 방법</th> </tr> <tr> <td>납(Pb)(mg/kg)</td> <td>0.0580mg/kg</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>카드뮴(Cd)(mg/kg)</td> <td>0.0390mg/kg</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>수은(Hg)(mg/kg)</td> <td>0.0580mg/kg</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>아연(Zn)(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> </table> <p align="right">2018년 4월 19일 한국기능식품연구원 (사)한국기능식품연구원 서울 연구개발본부 http://www.khfi.or.kr/ 연락처: 02-2638-0900-1</p>	제품명	GUCO	제조일자 (유통기한)		제조원	한국생활건강 감초추출물 연질캡슐 (대조군 샘플)	장 방	시험관	제조번호	제조번호: 2018-04-18	제조번호	제조번호	검사번호	제조번호: 2018041828	제조번호	제조번호	시험·검사 항목	시험·검사 결과	시험·검사 방법	납(Pb)(mg/kg)	0.0580mg/kg	중량법	카드뮴(Cd)(mg/kg)	0.0390mg/kg	중량법	수은(Hg)(mg/kg)	0.0580mg/kg	중량법	아연(Zn)(mg/kg)	검출불	중량법	<p>제 D2018041822 호 문자확인</p> <p align="center">시험·검사성적서</p> <table border="1"> <tr> <td>제품명</td> <td>GUCO</td> <td>제조일자 (유통기한)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>제조원</td> <td>한국생활건강 감초추출물 연질캡슐 (대조군 샘플)</td> <td>장 방</td> <td>시험관</td> </tr> <tr> <td>제조번호</td> <td>제조번호: 2018-04-18</td> <td>제조번호</td> <td>제조번호</td> </tr> <tr> <td>검사번호</td> <td>제조번호: 2018041822</td> <td>제조번호</td> <td>제조번호</td> </tr> </table> <p>본 시험은 유해물질 시험·검사성적서 발급을 위하여 실시되었습니다. 시험·검사 방법: 2018-04-18 시험·검사 일자: 2018년 4월 16일 검사기관: 한국기능식품연구원</p> <table border="1"> <tr> <th>시험·검사 항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사 방법</th> </tr> <tr> <td>대장균군</td> <td>검출</td> <td>시험·검사 방법</td> </tr> <tr> <td>총균수(CFU)</td> <td>0</td> <td>중량법</td> </tr> </table> <p align="right">2018년 4월 16일 한국기능식품연구원 (사)한국기능식품연구원 서울 연구개발본부 http://www.khfi.or.kr/ 연락처: 02-2638-0900-1</p>	제품명	GUCO	제조일자 (유통기한)		제조원	한국생활건강 감초추출물 연질캡슐 (대조군 샘플)	장 방	시험관	제조번호	제조번호: 2018-04-18	제조번호	제조번호	검사번호	제조번호: 2018041822	제조번호	제조번호	시험·검사 항목	시험·검사 결과	시험·검사 방법	대장균군	검출	시험·검사 방법	총균수(CFU)	0	중량법	<p>제 D2018041824 호 문자확인</p> <p align="center">시험·검사성적서</p> <table border="1"> <tr> <td>제품명</td> <td>GUCO</td> <td>제조일자 (유통기한)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>제조원</td> <td>한국생활건강 감초추출물 연질캡슐 (대조군 샘플)</td> <td>장 방</td> <td>시험관</td> </tr> <tr> <td>제조번호</td> <td>제조번호: 2018-04-18</td> <td>제조번호</td> <td>제조번호</td> </tr> <tr> <td>검사번호</td> <td>제조번호: 2018041824</td> <td>제조번호</td> <td>제조번호</td> </tr> </table> <p>본 시험은 유해물질 시험·검사성적서 발급을 위하여 실시되었습니다. 시험·검사 방법: 2018-04-20 시험·검사 일자: 2018년 4월 19일 검사기관: 한국기능식품연구원</p> <table border="1"> <tr> <th>시험·검사 항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사 방법</th> </tr> <tr> <td>Diazinof(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Diflufenican(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Disulfoton(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Diuron(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Malathion(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Methidathion(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Methoxyfenosulfuron(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Methidathion(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Boverat(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Bifenthrin(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Bifenthrin(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Cypermethrin(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Cypermethrin(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Cyhalothrin(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Acetamiprid(mg/kg)</td> <td>0.0045mg/kg</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Azinphos(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Azinphos(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> <tr> <td>Bifenthrin(mg/kg)</td> <td>검출불</td> <td>중량법</td> </tr> </table> <p align="right">2018년 4월 19일 한국기능식품연구원 (사)한국기능식품연구원 서울 연구개발본부 http://www.khfi.or.kr/ 연락처: 02-2638-0900-1</p>	제품명	GUCO	제조일자 (유통기한)		제조원	한국생활건강 감초추출물 연질캡슐 (대조군 샘플)	장 방	시험관	제조번호	제조번호: 2018-04-18	제조번호	제조번호	검사번호	제조번호: 2018041824	제조번호	제조번호	시험·검사 항목	시험·검사 결과	시험·검사 방법	Diazinof(mg/kg)	검출불	중량법	Diflufenican(mg/kg)	검출불	중량법	Disulfoton(mg/kg)	검출불	중량법	Diuron(mg/kg)	검출불	중량법	Malathion(mg/kg)	검출불	중량법	Methidathion(mg/kg)	검출불	중량법	Methoxyfenosulfuron(mg/kg)	검출불	중량법	Methidathion(mg/kg)	검출불	중량법	Boverat(mg/kg)	검출불	중량법	Bifenthrin(mg/kg)	검출불	중량법	Bifenthrin(mg/kg)	검출불	중량법	Cypermethrin(mg/kg)	검출불	중량법	Cypermethrin(mg/kg)	검출불	중량법	Cyhalothrin(mg/kg)	검출불	중량법	Acetamiprid(mg/kg)	0.0045mg/kg	중량법	Azinphos(mg/kg)	검출불	중량법	Azinphos(mg/kg)	검출불	중량법	Bifenthrin(mg/kg)	검출불	중량법									
제품명	GUCO	제조일자 (유통기한)																																																																																																																																										
제조원	한국생활건강 감초추출물 연질캡슐 (대조군 샘플)	장 방	시험관																																																																																																																																									
제조번호	제조번호: 2018-04-18	제조번호	제조번호																																																																																																																																									
검사번호	제조번호: 2018041828	제조번호	제조번호																																																																																																																																									
시험·검사 항목	시험·검사 결과	시험·검사 방법																																																																																																																																										
납(Pb)(mg/kg)	0.0580mg/kg	중량법																																																																																																																																										
카드뮴(Cd)(mg/kg)	0.0390mg/kg	중량법																																																																																																																																										
수은(Hg)(mg/kg)	0.0580mg/kg	중량법																																																																																																																																										
아연(Zn)(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
제품명	GUCO	제조일자 (유통기한)																																																																																																																																										
제조원	한국생활건강 감초추출물 연질캡슐 (대조군 샘플)	장 방	시험관																																																																																																																																									
제조번호	제조번호: 2018-04-18	제조번호	제조번호																																																																																																																																									
검사번호	제조번호: 2018041822	제조번호	제조번호																																																																																																																																									
시험·검사 항목	시험·검사 결과	시험·검사 방법																																																																																																																																										
대장균군	검출	시험·검사 방법																																																																																																																																										
총균수(CFU)	0	중량법																																																																																																																																										
제품명	GUCO	제조일자 (유통기한)																																																																																																																																										
제조원	한국생활건강 감초추출물 연질캡슐 (대조군 샘플)	장 방	시험관																																																																																																																																									
제조번호	제조번호: 2018-04-18	제조번호	제조번호																																																																																																																																									
검사번호	제조번호: 2018041824	제조번호	제조번호																																																																																																																																									
시험·검사 항목	시험·검사 결과	시험·검사 방법																																																																																																																																										
Diazinof(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Diflufenican(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Disulfoton(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Diuron(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Malathion(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Methidathion(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Methoxyfenosulfuron(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Methidathion(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Boverat(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Bifenthrin(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Bifenthrin(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Cypermethrin(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Cypermethrin(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Cyhalothrin(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Acetamiprid(mg/kg)	0.0045mg/kg	중량법																																																																																																																																										
Azinphos(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Azinphos(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Bifenthrin(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Bifenthrin(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Bifenthrin(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										
Bifenthrin(mg/kg)	검출불	중량법																																																																																																																																										

(5) 혈중중성지방 개선에 도움을 주는 건강기능성식품 개별인정 위한 CRO 기관 선정

□ 인체적용연구(CRO) 기관 선정 및 인체적용연구 수행

GUCO 복합물의 인체적용연구(CRO) 수행을 위한 업체로 4곳을 사전 검토하여, 최종 바이오푸드씨알오로 CRO 기관을 선정하였고, 현재 건강기능성식품 개별인정을 위한 인체적용시험 연구를 수행함.

항목	연구 내용
프로토콜 개발	문헌조사 및 분석, 전략수립, 디자인 설계, 프로토콜 개발
IRB 문서 개발	연구자 자료집, 증례기록서 문항 개발 등의 설명문 및 동의서 작성, 설문도구 및 매뉴얼, 연구진 관련 서류 준비 등
IRB 대응	초기, 변경심의 / 종료, 최종보고
e-CRF 개발 프로그램 개발	프로그램 설계·운용, 사용자 관리
대상자 관리	연구대상자 DB 스크리닝, 순응도 프로그램 운용 및 사용자 관리
모니터링	시험기관 방문 모니터링, CRF 및 순응도 관리 검증, 보고서 작성, 데이터 관리
통계분석	계획수립, 통계분석, 통계보고서 작성 등
결과보고서 작성	보고서 작성
프로젝트 관리	연구셋업, 프로젝트 개시 및 진행 관리
기타	e-CRF 시스템 개발/운영비(데이터 백업/보관, 웹호스팅, 시스템 유지/보수)
	순응도 관리 프로그램 웹호스팅, 시스템 유지/보수

* 인체적용연구 프로세스에 의해 연구 진행

추가로 현재 연구된 내용 및 인체적용시험, 개별인정 신청 준비 관련하여 식약처 영양기능연구팀 모둠 토의를 실시하였고, 피드백을 받았음.

- > 안전성 자료는 문헌으로 제출가능, 감초는 국내 다수의 연구 및 임상 데이터가 다수 있어 문제가 되지 않을 것이나 코코넛 MCT 오일 성분은 수율을 감안하여 코코넛오일의 원재료인 코코넛 양을 환산하여 기존 타제품과 비교 검토하여 안전한 수준의 양인지 섭취량 평가가 필요함.
- > 감초의 경우 국산감초 학명으로 국한해서 사용하였는데 나중에 식약처 심사 및 제품화 양산화하는데 제약사항이 적어질 수 있어 학명을 폭넓게 잡을 필요 있음.
- > 코코넛 MCT 오일은 해외 수입한 원료로 식품으로 수입하여 식품 규격에 맞게 수입하면 됨.
- > 해외 수입한 원료로 유해물질 규격 및 성분에 관한 규격을 설정할 필요가 있으며 수입 시 해외업체에서 규격 설정 자료 공유 가능한지 확인해보고 규격 설정 필요
- > 지표성분 코코넛오일의 라우르산과 감초의 글리시리진, 리퀴리틴으로 선정한 특이성과 관련된 증빙 자료가 있어야 함

일	세	주	부	관	연	구	관	과	장
이	성	성	성	성	성	성	성	성	성

민원 상담 일지

일시 2017년 12월 26일 상담장소 민원실
 상담 종류 신약의 적용 검토
 복자 정보 (업체명) (주)바이오에이지 연구개발인강 (성명) 박혜민 (연락처) 010-9226-1230
 제품 정보 코코넛오일간유추출분말혼합물 (혈중 중성지방 개선)

민원인			상담자		
희사항	직위	성명	과명	직급	성명
(주)바이오에이지 연구개발인강	소장	이성성	영양기능연구팀	주무관	문영희
			영양기능연구팀	실사관	장세희
질의 내용			답변 내용		
- 기존규격에 대한 문의 * 해당 오일 (MCT) 과 감초의 (라우르산) 함유량에 대한 문의, 해당 오일, 감초의 함유량, 라우르산, 리퀴리틴 함유량에 대한 문의 * 관련 유해물질 규격에 대한 문의, 국내제조기준에 대한 문의			- 지방산의 함유량, 함유량 측정 방법, 함유량 측정 방법, 함유량 측정 방법		
- 신약성에 대한 문의			- 의약품으로서의 함유량, 함유량 측정 방법, 함유량 측정 방법		
- 기능성에 대한 문의			- 관련 문헌자료 및 해당 규격에 대한 문의, 관련 문헌자료 및 해당 규격에 대한 문의, 관련 문헌자료 및 해당 규격에 대한 문의		

(6) 혈중중성지방 개선 건강기능식품 제품개발 및 제품의 홍보, 마케팅 전략 수립

제품 홍보 및 마케팅을 위한 사전조사로 고전서에 나와 있는 과학적 자료나 역사적 사용 기록 자료를 조사하여 정리함.

○ 「기존 한약서에 대한 잠정규정(보건복지부고시)」에서 정한 한약서 기록

- 동의보감(東醫寶鑑, 1613)

처방명	편명	주치병증	사용량
대황감초음자(大黃甘草飲子)A	잡병편(雜病篇) 권육(卷六) 소갈(消渴)	소갈	150g(다린물)
대조중탕(大調中湯)A	내경편(內景篇) 권이(卷二) 담음(痰飲)	허담	
인진부자탕(茵陳附子湯)	잡병편(雜病篇) 권육(卷六) 황달(黃疸)	신랭/음황	3.75g(구운 것)
마황부자감초탕(麻黃附子甘草湯)A	잡병편(雜病篇) 권이(卷二) 한(寒)	궤역/소음병	7.5g
인진사역탕(茵陳四逆湯)A	잡병편(雜病篇) 권육(卷六) 황달(黃疸)	음황/자한	3.75g
증손사물탕(增損四物湯)A	잡병편(雜病篇) 권십(卷十) 부인(婦人)	산후출혈부지	-
사순탕(四順湯)A	잡병편(雜病篇) 권이(卷二) 한(寒)	복통	7.5g
사순이중탕(四順理中湯)	잡병편(雜病篇) 권이(卷二) 한(寒)	복통자리	7.5g
가미오령산(加味五苓散)A	내경편(內景篇) 권사(卷四) 소변(小便)		
조위승기탕(調胃承氣湯)A	잡병편(雜病篇) 권이(卷二) 한(寒)	대변경, 상한 이증, 섬어, 소 변적, 조열	3.75g
사순원(四順元)	잡병편(雜病篇) 권이(卷二) 한(寒)	구토부지, 변 민, 복통, 복통 자리	7.5g
사순이중환(四順理中丸)	잡병편(雜病篇) 권이(卷二) 한(寒)	구토부지, 변 민, 복통	7.5g
피난지소아곡법(避難止小兒 哭法)B	잡병편(雜病篇) 권구(卷九) 잡방(雜方)	-	
신선침사원(神仙沈麝元)	내경편(內景篇) 권일(卷一) 기(氣)	기통	75g
접명단(接命丹)A	외형편(外形篇) 권삼(卷三) 제(臍)	몽설/자한/허 손/하초허열	75g
국로고(國老膏)A	잡병편(雜病篇) 권팔(卷八) 옹저(癰疽)	현옹	37.5g
치시감초탕(梔豉甘草湯)A	잡병편(雜病篇) 권이(卷二) 한(寒)	소기/흉만	
온금산(溫金散)C	잡병편(雜病篇) 권오(卷五) 해수(咳嗽)	노수	37.5g
대온중환(大溫中丸)A	잡병편(雜病篇) 권육(卷六) 황달(黃疸)	황달/황반/황 종	7.5g
저제탕(豬蹄湯)A	잡병편(雜病篇) 권칠(卷七) 옹저(癰疽)	유구풍	3.75g
삼성단(三聖丹)A	잡병편(雜病篇) 권오(卷五) 해수(咳嗽)	담수	18.75g
치약고자(痔藥膏子)	외형편(外形篇) 권사(卷四) 후음(後陰)	외치/종통/탈 항	3.75g
유사탕(榆砂湯)B	내경편(內景篇) 권이(卷二) 혈(血)	변혈(便血)	3.75 g
이감탕(二甘湯)A	외집권2(外集卷二), 잡병용약부 하(雜病用 藥賦 下), 한(汗)	위열/한출부지	-
청양탕(淸陽湯)	잡병편(雜病篇) 권이(卷二) 풍(風)	중풍구와	1.875g
익황산(益黃散)C	잡병편(雜病篇) 권십일(卷十一) 소아(小)	만경풍	1.875g

	兒)		
인삼익기탕(人蔘益氣湯)A	외형편(外形篇) 권삼(卷三) 피(皮)	마목	1.875g
동원서점자탕(東垣鼠粘子湯)	외형편(外形篇) 권일(卷一) 이(耳)	이내생창(耳內生瘡)	1.875 g.
생진감로탕(生津甘露湯)A	잡병편(雜病篇) 권육(卷六) 소갈(消渴)	대변조결, 소중, 소변수증	4.125g
용뇌파독산(龍腦破毒散)A	외집권2(外集卷二), 잡병용약부 하(雜病用藥賦 下), 인후(咽喉)	후비색	28.25g
화혈익기탕(和血益氣湯)A	잡병편(雜病篇) 권육(卷六) 소갈(消渴)	소갈	1.125g
감담환(甘膽丸)	잡병편(雜病篇) 권오(卷五) 해수(咳嗽)	천수(喘嗽)	75g
선퇴탕(蟬退湯)	잡병편(雜病篇) 권십일(卷十一) 소아(小兒)	두진/요복통	5.625 g.
익원산(益元散)A	외집권1(外集卷一), 상한용약부(傷寒用藥賦), 정상한(正傷寒)	곽란/서열번갈	37.5g
지각육일산(枳殼六一散)	잡병편(雜病篇) 권십(卷十) 부인(婦人)	태기옹만(胎氣壅滿)	37.5g
거수고(去水膏)	잡병편(雜病篇) 권칠(卷七) 응저(癰疽)	응저(癰疽)	9.375 g(생것)
천수산(天水散)A	잡병편(雜病篇) 권삼(卷三) 서(暑)	응폐/장벽/중서	37.5g
감초탕(甘草湯)A	잡병편(雜病篇) 권이(卷二) 한(寒)	소음객열/인통	15g
육일산(六一散)A	잡병편(雜病篇) 권삼(卷三) 서(暑)	곽란토사	37.5 g.

- 의학입문(醫學入門, 1575)

처방명	편명	주치병증	사용량
작약감초탕(芍藥甘草湯)C	외집권1(外集卷一), 상한용약부(傷寒用藥賦), 초증(初證)	번조/상한자한/소변삭/심번	11.25(끓여 따뜻하게 복용)
단감초탕(單甘草湯)	상한용약부(傷寒用藥賦) - 잡증(雜證)	객열/양사/인통	37.5g
해천오부자독(解川烏附子毒)	-	부자독/천오독	-
양장환(羊臟丸)	외집(外集)-잡병용약부 상(雜病用藥賦 上)-이(痢)	오색리(五色痢)	18.75g
법제반하(法製半夏)A	-	담	75g
거사환(祛邪丸)	잡병용약부상(雜病用藥賦 上)	학/한열왕래	75g
도씨계령음(陶氏桂苓飲)	외집(外集)-상한용약부(傷寒用藥賦)-잡증(雜證)	광언/번조	-
청호음(靑蒿飲)	외집2권(外集卷二) 잡병용약부 하 (雜病用藥賦 下) 제충(諸蟲)	골증조열/노채	-
청호고(靑蒿膏)	집2권(外集卷二) 잡병용약부 하 (雜病用藥賦 下) 제충(諸蟲)	충병	-
주자당귀환(酒煮當歸丸)B	편주의학입문외집2권(編註醫學入門外集卷二) 잡병용약부 상(雜病用藥賦 上) 복통(腹痛)	소복통/퇴산	18.75g
대순산(大順散)A	잡병편(雜病篇) 권삼(卷三) 서(暑)	냉습/번갈/인음/토사	75g
소독보영단(消毒保嬰丹)B	외집(外集)-소아문 하(小兒門 下)-두(痘)-채증(瘡證)	-	18.75g

치자감초시탕(梔子甘草豉湯)A	-	소기/흉만	7.5g
대순산(大順散)B	외집(外集)-잡병용약부상(雜病用藥賦上)-서류(暑類)	곽란토사	150g
용뇌파독산(龍腦破毒散)B	외집권2(外集卷二),잡병용약부 하(雜病用藥賦 下),인후(咽喉)	인후증, 인후폐색, 후비	28.25 g
고마감탕(古麻甘湯)	잡병용약부 상(雜病用藥賦 上) - 습류(濕類) - 수종(水腫)	수종	3.75g

- 수세보원(壽世保元)(17세기초)

처방명	편명	주치병증	사용량
정농탕(淨膿湯)	기집육권(己集六卷)	폐옹	150g
중독(中毒)	계집십권(癸集十卷)	백독(白朮)	-
택사산(澤瀉散)B	신집팔권(辛集八卷)	비창(肥瘡)	3.75(구운 것)
국노탕(國老湯)	임집구권(壬集九卷)	현옹(懸癰)	37.5g
인삼파독산(人參敗毒散)	계집십권(癸集十卷)	두통항강/상풍/상한시기	1개
신효소독보영단(神效消毒保嬰丹)	신집팔권(辛集八卷)	두창	18.75 g.
최생신작음(催生神柞飲)	경집칠권(庚集七卷)	난산(難産)	18.75 g.

- 경약전서(景岳全書)(1610년)

처방명	편명	주치병증	사용량
해오두초오독(解烏頭草烏毒)	권지육십 주집 고방팔진 인진(卷之六十 宙集 古方八陣 因陣)-226	오두독/초오독	-
마황감초탕(麻黃甘草湯)C	권지오십육 자집 고방팔진(卷之五十六 字集 古方八陣),산진(散陣)6	수종중요이상구종	9.375g
대순산(大順散)E	권지오십팔 주집 고방팔진(卷之五十八 宙集 古方八陣)열진(熱陣)78	곽란토사, 복열, 서감	112.5g
백편두산(白扁豆散)C	권지육십 주집 고방팔진 인진(卷之六十 宙集 古方八陣 因陣)-205	제독입복	-
작약감초탕(芍藥甘草湯)G	우집 고방팔진 한진(宇集 古方八陣 寒陣) 67	각연급	150g
승양산화탕(升陽散火湯)G	권지오십육 자집 고방팔진 산진(卷之五十六 字集 古方八陣 散陣)41	울결/위허/혈허	1.125g
해일절식독(解一切食毒)	권지육십 주집 고방팔진 인진(卷之六十 宙集 古方八陣 因陣)-210	음식중독, 음주	75g

- 방약합편(方藥合編)(1884년)

처방명	편명	주치병증	사용량
맥문동탕(麥門冬湯)B	중통(中統)	노복	11.25g
승양제습화혈탕(升陽除濕和血湯)B	하통(下統)	복통/장벽하혈	1.875g
국로고(國老膏)B	방약합편(方藥合編)(1884년)	현옹	37.5g

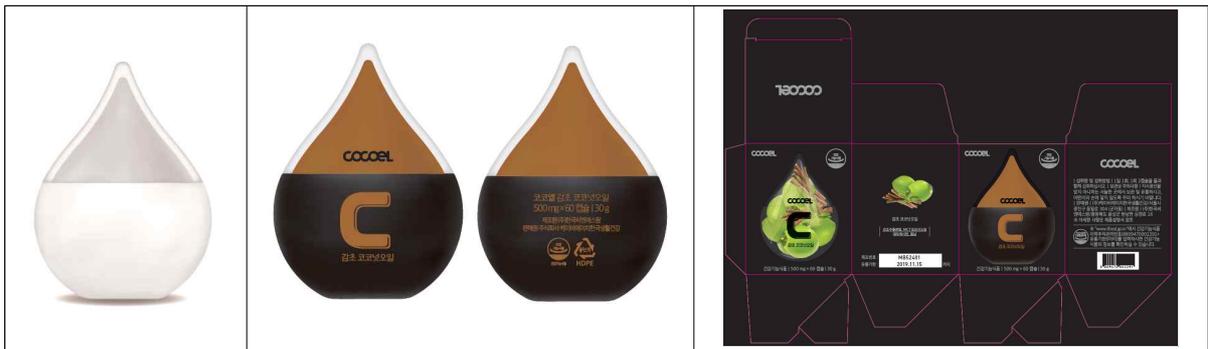
○ 향약집성방, 광제비급, 제증신편, 동의수세보원, 본초강목에는 사용기록 없음

○ 「기존 한약서에 대한 잠정규정(보건복지부고시)」에서 정한 한약서 이외 기록

- 의학정전(醫學正傳)(1515년) : 대황감초음자(大黃甘草飲子)B, 작약감초탕(芍藥 草湯)E, 황기음(黃芪飲), 통맥사역탕(通脉四逆湯), 감길탕(甘桔湯)E, 침향강기탕(沈香降氣湯)F 등
- 태평혜민화제국방(太平惠民和劑局方)(11세기) : 출부탕(朮附湯), 유오향련교탕(五香連翹湯)B 대순산(大順散)D, 쾌기탕(快氣湯)C, 초두구산(草苳薏散), 소독산(消毒散)B 등
- 의종금감(醫宗金鑑) : 감초소맥대조탕(甘草小麥大棗湯), 청육산(靑六散), 감맥대조탕(甘麥大棗湯)B, 대황감초탕(大黃甘草湯)C, 치자감초시탕(梔子甘草豉湯)C, 자삼탕(紫蓼湯), 조위승기탕(調胃承氣湯)G 등
- 세의득효방(1345) : 감초산(甘草散), 독승산(毒勝散), 졸폭(卒暴)의우방(又方)C, 음낭상창(陰囊上瘡), 국로음(國老飲)의우방(又方), 셋방(洗方)의우방(又方)A, 온중산(溫中散)B, 구기탕(九氣湯) 각서산(却暑散), 출부탕(朮附湯)D 등

또한, 제품개발을 위한 용기는 자연 원료에서 추출한 엑기스를 물방울로 형상화하여 자연 그대로의 이미지를 표현하였고, 브랜드명은 “COCOEL”을 사용하여 기존 “COCOEL(코코넛오일 제품)” 브랜드에 감초 코코넛오일 복합물 관련 건강기능식품을 브랜드에 추가함. 갈색(감초의 색)을 캡 색으로 하여 감초 이미지화한 것임.

[제품 용기 및 단상자 디자인 개발]



위 용기에 대한 디자인 등록을 위해 특허청에 디자인 출원을 하였고, COCOEL 브랜드는 해외 마드리드 출원을 진행하여 지재권을 통한 권리 확보를 함.

(7) 임상시험을 위한 IRB 신청/승인 및 임상시험 실시(CRO의 자료 수집)

- 인체적용연구 요약

연구제목	GUCO복합물의 혈중 중성지방 개선효과와 안전성을 평가하기 위한 인체적용연구
연구의뢰자 및 지원기관	(주)한국생활건강, 농림축산식품부
연구총괄책임자	인하대학교 의과대학 의생명학교실 이운규 교수
연구책임자	인하대학교병원 직업환경의학과 임종한 교수
연구기관명/주소	인하대학교병원(인천광역시 중구 인항로 27) * 연구대상자 모집 및 방문은 인하대학교병원에서 이루어지며, 일부 인체유래물 분석은 녹십자랩셀에서 수행됨.
연구기간	IRB 승인일로부터 12개월
연구대상	혈중 중성지방 수준이 150 mg/dL 이상이면서 약제 치료가 필요하지 않은 만 20세 이상의 성인 남녀
연구목적	혈중 중성지방 수준이 높은 자를 대상으로 GUCO복합물의 섭취가 혈중 중성지방 개선 및 안전성에 미치는 영향을 평가함
연구디자인	12주간 섭취, 무작위배정, 이중맹검, 평행설계, 대조식품 비교 연구
시험식품	GUCO복합물이 함유된 캡슐(GUCO복합물 440 mg/캡슐)
대조식품	Placebo(GUCO복합물이 함유되어 있지 않고, 대두유를 주원료로 하는 시험식품과 외형과 성상이 동일한 캡슐)
섭취방법	1일 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐을 충분한 물과 함께 섭취(GUCO복합물 1,760 mg/일)
연구방법	<p>방문 1 / -2주 (Screening) 방문 2 / 0주 (Randomization) 방문 3 / 6주 방문 4 / 12주 (Completion)</p> <p>기능성평가 임상병리검사 기능성평가 기능성평가 임상병리검사</p> <p>방문 1(-2주)에 자의에 의해 인체적용연구 동의서에 서명한 지원자는 선정·제외기준에 따라 적합성 여부를 판정 받는다. 선정된 대상자는 2주간의 run-in period 후 방문 2(0주)에 등록된 순서에 따라 대조군 또는 시험군 중 한 군에 무작위배정되어 12주간 시험식품 또는 대조식품을 섭취한 후 기능성 바이오마커를 분석한다.</p>
연구대상자 수	각 군당 목표 대상자수는 50명(중도탈락률 20% 고려)으로 선정기준에 적합한 대상자를 총 100명 등록시키기로 한다.
연구대상자 선정 기준	다음 기술된 조건을 모두 만족하는 자를 연구대상자로 선정한다. 1) 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자 2) 만 20세 이상의 성인 남녀 3) 혈중 중성지방 수준이 150mg/dL 이상이면서 200mg/dL 미만인 만20세 이상의 성인 남녀
기능성 평가	<ul style="list-style-type: none"> 지질 수준 및 관련 대사 지표 [0, 6, 12주] <ul style="list-style-type: none"> 중성지방, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, VLDL-콜레스테롤, Apo B100, Apo CII 혈당, 인슐린 신체계측 [0, 6, 12주] <ul style="list-style-type: none"> 체중, 허리둘레, 엉덩이둘레 등 <p>* 위의 분석 결과에 따라 지질대사 관련 생화학적 지표, 유전자 분석 등을 추가 시행할 수 있으며, BMI, HOMA-IR 등과 같은 인덱스를 계산할 수 있음.</p>
안전성 평가	이상반응, 활력징후, 임상병리검사(일반혈액검사 및 소변 검사)

- 연구 진행 일정표

Period	Screening	intervention		
		2	3	4
Visit	1	2	3	4
Week	-2	0 ¹⁾	6	12
Window period(day)			±5	-3~+7
연구대상자 동의	√			
인구학적 특성 ²⁾	√			
활력징후(맥박, 혈압, 체온)	√	√	√	√
병력 및 수술력 조사	√			
약물·건강기능식품 섭취 조사	√	√	√	√
체질량지수(BMI)	√			
신체계측(체중, 신장, 허리둘레, 엉덩이둘레) ³⁾		√	√	√
활동량 조사 ⁴⁾	√	√	√	√
음주력·흡연력 조사	√	√	√	√
식습관 조사 ⁵⁾	√	√	√	√
임신반응검사 ⁶⁾	√			
혈중 중성지방 ⁷⁾	√			
적합성 평가	√			
무작위배정		√		
식이·생활습관 교육	√	√	√	
식이·생활습관 모니터링 ⁸⁾		√	√	√
임상병리검사(혈액, 소변 검사) ⁹⁾		√		√
기능성 평가 ¹⁰⁾		√	√	√
시험·대조식품 배부		√	√	
반납식품 회수 및 순응도 확인 ¹¹⁾			√	√
이상반응 확인	√	√	√	√

최종 IRB 승인 및 인체적용연구를 위하여 GUCO 복합물의 인체적용연구에 대한 인하대병원 연구윤리심의위원회의 IRB 승인을 진행하여 승인을 받았습니다.

통지서

※ 본 표제의 모든 보존기간은 3년입니다.

수신	의뢰(지환)기관	주식회사 케이비에이치한국생명공학
연구책임자	직업환경의학과 김환철	
IRB File No.	INH-AUH 2018-06-022-001	심사내용
연구과제명	국문	GUCO복합물의 혈중 중성지방 개선효과와 안전성을 평가하기 위한 인체적용연구
임상시험코드	영문	
		Study Nick Name

연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물	<input type="checkbox"/> 생물학적 제제	<input type="checkbox"/> 세포치료제	<input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품
	<input type="checkbox"/> 의료기술	<input type="checkbox"/> 의료가기 (<input type="radio"/> 1등급 <input type="radio"/> 2등급 <input type="radio"/> 3등급 <input type="radio"/> 4등급)		
	<input type="checkbox"/> 해당사항 없음			
연구분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구	<input type="checkbox"/> 인체유래물(장제)연구	<input type="checkbox"/> 의무기록연구	
	<input type="checkbox"/> 유전자연구	<input type="checkbox"/> 유전자 치료		
	<input type="checkbox"/> 배아연구	<input type="checkbox"/> 체세포복제배아연구	<input type="checkbox"/> 줄기세포주연구	
	<input type="checkbox"/> 기타 ()			
연구분류3	<input checked="" type="checkbox"/> 관찰적 연구	<input type="checkbox"/> 후향적 연구	<input type="checkbox"/> 전향적 & 후향적 병행연구	
	<input checked="" type="checkbox"/> 중재연구	<input type="checkbox"/> 설문조사	<input type="checkbox"/> 자료분석 및 분석연구	
연구분류4	<input type="checkbox"/> 관찰연구 (<input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 환자대조군연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구)			
	<input type="checkbox"/> 기타 ()			
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)			
일반명	GUCO복합물		상품명	
전체시험자총래수	전체 100명	국내 100명	본원 100명	
연구승인기간	2018.07.16 ~ 2019.07.15			
지원의뢰기관	기관명	주식회사 케이비에이치한국생명공학	대표(직위)	성명
				지정근
제출서류목록	(첨부) 연구계획서 [1.1] [10 / Jul / 18] (첨부) 연구대상자 설명문 및 동의서 [1.1] [1] (첨부) 중재기후서 [1.1] [10 / Jul / 18] (첨부) 모성 골고름 [1.1] [1] (첨부) 이해상충서약서 [1] [1]			

제출서류목록	(첨부) 연구비 산정내역서 [1] [1] (첨부) 보완답변서 [1] [1] (첨부) 변경대상자료 [1] [1] (첨부) IPAG [1.1] [1] (첨부) RFS [1.1] [1] (첨부) MEDFACTS [1.1] [1] (첨부) 식이 및 생활습관 일지 [1.1] [1] (첨부) 분할중지 [1] [1] (첨부) 연구윤리감형서약서 [1] [1]
관련근거	평가일자 2018.07.16
중간보고시기	2019년 05월 15일까지
심사결과	<input checked="" type="checkbox"/> 승인 <input type="checkbox"/> 시정승인 지정계획 검토 결과, 보완 내용이 적절한 것으로 확인되어 연구진행을 승인합니다. * 대상자 설명문 및 동의서는 하단의 통지서 첨부파일로 전달되는 IRB 승인번호 출력화하여 사용하시기 바랍니다. IRB 승인번호는 "UH IRB APPROVED(승인일)"이 삽입되어 있습니다.

※ 본 통지서에 기재된 사항은 인하대병원 연구윤리심의위원회의 기록된 내용과 일치함을 증명합니다.
 ※ 본 위원회는 ICH-GCP 및 KGCP를 준수하며, 생명윤리 및 안전에 관한 법률 등 관련법규를 준수합니다.
 ※ 본 연구와 이해상충관계(Conflict of Interest)가 있는 위원이 있을 경우 심의에서 배제하였습니다.
 ※ 보편을 요하는 시장승인(신속심사), 보완(재심사) 시에는 보완서류를 6개월 이내에 제출하여야 하며, 기한 내 다시 제출되지 않은 계획서는 승인되지 않을 것으로 간주합니다.
 ※ 만약 본 위원회의 심의결과에 불복할 경우, 상의결과 통보 후 그 사유를 기록하여 이의를 신청할 수 있습니다.
 ※ 위원회의 승인은 1년을 초과할 수 없습니다. 1년 이상 연구를 지속하고자 하는 경우에는 반드시 지속심의를 받아야 하며, 위원회의 보고 주기에 따라 연구 진행과 관련한 보고서를 제출해야 합니다.
 ※ 본원에서 수행된 연구 결과는 본원의 사전 서면동의 없이는 학술 목적 이외에 어떤 경우라도 실시기관명을 사용할 수 없습니다.

인하대병원 연구윤리심의위원회



1 / 2



2 / 2

IRB 승인 이후에 GUCO복합물의 인체적용연구 계약서 내용 공유 및 책임자들과의 개시모임을 실시하였고, 인하대병원 내에서 인체적용연구 대상자 모집을 홍보하고, 임상시험을 진행 중임.

연구 계약서(의뢰자주도)

연구과제명: GUCO 복합물의 혈중 중성지방 개선효과와 안전성을 평가하기 위한 인체적용연구

위 임상연구에 관하여 계약 당사자들은 다음과 같이 임상연구 계약을 체결한다.

연구계약 당사자:

(갑) 주식회사 케이비에이치한국생명공학 대표이사 지정근 (의뢰기관장)

(을) 주식회사 바이오우즈바이오 대표이사 김미경 (임상시험수탁기관장)

(병) 인하대학교 산학협력단 단장 이성규 (위탁연구기관장)

인하대학교 의과대학 의생명학교실 교수 이운규 (연구총괄책임자)

제 1 조 (연구신청) (을)은 위 임상연구에 관한 소정의 구비서류를 작성하여 (병)에게 제출한다.

제 2 조 (연구의 목표 및 내용) GUCO 복합물의 혈중 중성지방 개선효과와 안전성을 평가하기 위한 인체적용연구의 목표 및 내용은 연구계획서(별첨 1)에 명시된 내용으로 한다.

제 3 조 (연구기간) 연구기간은 IRB 승인일로부터 1년까지만 한다. 단, IRB 에서 기간 연장 승인한 연구중요일이 계약 만료일 이후일 경우, IRB 에서 승인된 연구중요일을 계약의 만료일로 한다. 연구기간은 추후 (갑), (을), (병)의 합의에 의해 변경될 수 있다.

제 4 조 (관련규정) 계약당사자들은 연구의 실시 및 연구결과에 대하여 의학용어상시행관리기준(KGCP)의 규정에 따라 기관연구윤리심의위원회의 심의를 거쳐야 하며 KGCP, 관계 법원 및 임상연구계획서, 심사위원회의 승인 사항에 따라 임상연구를 실시하여야 한다. 본 연구는 연구기관의 임상연구 관리 규정 및 임상연구관련 정책 등을 준수한다.

제 5 조 (연구책임자) (병)의 연구총괄책임자 및 연구책임자는 임상연구를 총괄하며 임상연구가 임상연구계획서에 준하여 적절히 실시되고 있는지 확인, 감독하고 (갑), (을) 및 중추연구자와 상호 연락하여 협의해야 한다.

제 6 조 (계약당사자의 의무)

- (갑)은 연구에 대한 정, 안전, 윤리를 모니터링하고 평가하기 위해 (병)의 정적과 절차를 준수하여야 하며, 연구를 시행할 때에는 훈련되고 자격이 있는 연구원을 기용하여 연구자원의 타당도와 신뢰도를 보장하여야 한다.
- (갑), (을) 및 (병)은 연구과정에서 수집된 연구대상자 데이터의 비밀 및 사생활을 보호한다.



(8) 혈중중성지방 개선 건강기능식품(개별인정) 기능성 원료 신청 및 승인을 위한 자료 보완/품목허가 신고

□ 식약처 인체적용시험 대상자 확대 관련 개정사항 검토, 사전검토 신청

2018년 11월에 식약처(영양기능연구팀)에서 개별인정형 기능성 원료 인정관련 개정사항에 대한 민원설명회를 개최하였고, 본 연구개발의 기능성인 혈중중성지방 개선에 대한 대상자 확대 및 세부 기능성 인정에 대한 개선사항이 이루어질 것으로 예상됨.

인체적용시험 대상자 확대

문제점	검토사항	개정
건강인, 반(半)건강인으로 한정하여 인체적용 시험 수행 시 기능성 입증 한계점 내포	<p>관련 수치가 경계영역에 포함되어 환자에 해당되더라도 전문의 판단에 따라 약물복용 없이 식사요법과 운동으로 조절중인 대상자를 포함하여 인체적용 시험이 가능 하도록 확대 방안 검토</p> <p>※ 인체적용시험 대상자 확대를 위한 전문가 회의 개최 (2018.5.25.)</p> <p>「건강기능식품 기능성 평가가이드 (체지방감소 등 10종) 개선 연구(Ⅰ)」 사업 수행 중 (2018.5.16~12.15)</p>	<p>「건강기능식품 기능성 평가가이드」 개정 시 관련 사항 반영</p> <p>[2019. 상반기 발간예정]</p> <p>※ 혈당, 콜레스테롤, 혈압, 중성지방, 체지방의 5개 기능성에 우선 적용 시행예정</p>

※ 시험대상자 및 건강기능식품을 섭취하는 소비자의 안전성을 위해 대상자 선정기준에 반드시 약물을 복용하거나 기저질환을 가진 대상자는 배제

● 개선 사항

지표성분 설정지원

❖ 백수오 사건 이후 지표성분 설정에 대한 심사강화에 따라 자료 제출 부담

개선 내용
<ul style="list-style-type: none"> 건강기능식품 원료에 대한 지표성분 재설정 관련 연구사업 수행 중(400여개의 원료) 유사원료의 혼입 방지를 위하여 원재료 별(동·식물 등) 특이성 있는 지표성분 목록 및 시험방법 단계적 제공 지표성분 DB 구축 및 정보제공 예정

평가가이드 개정

❖ 건강기능식품 기능성원료 평가가이드(민원인 안내서)의 지속적인 개정 요청

개선 내용
<ul style="list-style-type: none"> 건강기능식품 기능성 평가가이드 개선(인) 관련 연구사업 수행 중 과학의 발전과 함께 특이적이며 예측성이 높은 바이오마커를 지속적으로 추가 발굴하고, 이에 대한 적정성 등을 검증하여 지속적 업데이트 자료 제공 소재개발자의 연구개발비의 비중이 가장 높은 기능성 평가에 대한 가이드 제시로 비용과 시간 절감으로 경제적 이득에 기여 2018년(10종) → 2019년~2020년(20종 + 신규기능성)

● 개선 사항

세부 기능성 인정

요구 사항 • 추측기전을 반영하여 구체적 클레임 표시 가능도록 요청
- (현재) 세부클레임은 관련 기능성의 기전 등의 검토를 통해 탄력적으로 인정하고 있음

기능성	세부 Claim 내용
혈당 조절에 도움	• 설당 소외물수를 원만하게 하여 혈당조절에 도움을 줄 수 있음
혈중 중성지방 개선에 도움	• 디글리세라이드(Diacylglyceride)를 함유하고 있어 다른 식용유와 비교하였을 때 식후 혈중 중성지방과 체지방 증가가 적을 수 있음
면역기능 개선에 도움	• 과도한 운동 후의 L-글루타민 보충은 신체 저항능력 향상에 도움이 될 수 있음 • 과민반응에 의한 코 삼태(코 가려움, 재채기, 콧물) 개선에 도움을 줄 수 있음 • 꽃가루에 의해 나타나는 코막힘의 개선에 도움을 줄 수 있음
피부건강에 도움	• 자외선에 의한 피부홍반개선으로 피부건강에 도움을 줄 수 있음
혈행개선에 도움	• 혈액의 끈푼을 방해할 수 있는 혈소판응집을 억제하는데 도움을 줄 수 있음
간건강에 도움	• 알콜성 손상으로부터 간을 보호하는데 도움을 줄 수 있음
눈 건강에 도움	• 건조한 눈을 개선하여 눈 건강에 도움을 줄 수 있음 • 노화로 인해 감소될 수 있는 황반색소밀도를 유지시켜 주어 눈건강에 도움을 줌
위 건강/소화기관 개선에 도움	• 담즙분비를 촉진하여 지방 소화에 도움을 줄 수 있음 • 위 정막 내 헬리코박터(Helicobacter pylori) 증식을 억제하고 위 점막을 보호하여 위 건강에 도움을 줄 수 있음

자료: 개별인정형 기능성 원료 인정관련 개정사항, 식품의약품안전평가원, 2018.11.08.

이에 따른 일환으로 본 연구개발의 인체적용시험 대상자 선정기준 확대를 위하여 혈중중성지방 수준 확대 건으로 식약처 사전검토를 신청하여, 대상자 중에 환자가 제외될 수 있는 범위(상한치)를 명시하는 것으로 식약처의 답변을 받았음.

- 기존) 혈중중성지방 수준 155mg/dL 이상 200mg/dL 미만 ⇒ 변경) 150mg/dL 이상 300mg/dL 미만.

(인체적용시험 사전검토 신청서)

인체적용시험계획서 사전검토 신청서

* 바탕색이 어두운 칸은 신청인이 적지 않으며, []에는 해당되는 곳에 √표를 합니다.

접수번호	접수일	처리기간
가능성 원료	GUCO복합물(감초물추출물+MCT코코넛오일)	
인체적용시험 제목	GUCO복합물의 혈중 중성지방 개선효과와 안전성을 평가하기 위한 인체적용연구	
□ 일반사항		
신청인	상호 (주)한국생활건강	전화번호(팩스번호) 070-4640-0243(02-6280-1828)
	주소 서울특별시 광진구 동일로 304(군자동)	
	담당자명 김한수	전화번호(팩스번호) 070-4640-0243(02-6280-1828)
	휴대전화번호 010-8482-3393	전자메일주소 khs419@kjh.kr
시험기관	시험기관명 인허내과병원	주소 인천광역시 중구 인항로 27
	책임연구자명 임종환	소속 인허내과병원직업임경의학과

□ 사전검토 신청내용		
시험디자인	[√] RCT, [√] DB, [√] Parallel, [] Cross-over, [] 기타()	
대상자수	대상자 선정기준	대상자 제외기준
100명	1) 본 연구에 참여를 동의하고, 서면 동의서에 서명한 자 2) 만 20세 이상의 성인 남녀 3) 혈중 중성지방 수준이 150 mg/dl 이상인 채 지료가 필요하지 않은 자	1) 강도 높은 운동을 규칙적으로 하는 자(≥10시간/주) 2) 만성 흡연자(≥ 20개비/일) 3) 알코올 중독자 또는 평소 알코올을 420g/주(소주 2주 약 7병/주) 이상 섭취하는 자 4) 체질량 지수(BMI)가 20kg/m ² 미만 또는 35kg/m ² 이상인 자 5) 식사의 질이 좋은 자(Recommended Food Score > 36) 6) 다음의 질환이 있거나 기뢰력이 있는 자 : 고지혈증, 당뇨병, 고혈압, 간질환, 장정맥(염증성 장질환, 유당불내증 포함), 신장질환, 심혈관계질환, 뇌혈관계 질환, 췌장염, 암, 갑상선질환, 치매, 파킨슨병, 우울증, 거식증/대식증, 다발성 경화(multiple sclerosis), 척추의 외상, 저칼륨혈증, 저칼슘혈 등 7) 첫 번째 방문 전 1개월 이내에 다음의 약물을 복용하였거나 연구기간 동안 복용이 예측되는 경우 : 지질강화제(UJCA, 스타틴 등), 혈당강화제, 항생제, 장기능에 영향을 미칠 수 있는 의약품, 호르몬, 경구 피임약, 체중감량제, 식욕억제제/속진제, 이뇨제, 베타차단제, 피임약, 스테로이드 제제, TCA제제, 완하제(laxatives), 항우울제 등. 단, 이뇨제 중 thiazide와

시험기관	시험방법	시험대상
시험기관명 인허내과병원	시험방법 1) 2회(아침, 저녁), 1회 2캡슐을 충분한 물과 함께 섭취	시험대상 베타차단제의 경우 1년간 용량 변동 없이 복용하고 연구 참여 동안 용량 변동이 없도록 예측될 경우 대상자에 포함시킬 수 있음. 8) 첫 번째 방문 전 1개월 이내에 항약을 지속적으로 섭취한 경우 9) 첫 번째 방문 전 1개월 이내에 지질, 혈당, 체지방 대사에 영향을 미치는 건강기능식품(식모스태롤, 오메가-3, 지반산, 치전지피, 알로에, 키토산, 안파추출액, 난소화성탈토텍스트린, 식이섬유 등)를 지속적으로 섭취한 자 10) 시험식품이나 시험식품에 함유된 성분에 대한 과민증이 있는 경우 11) 첫 번째 방문 전 1개월 이내에 임상연구에 참여한 자 12) 임신부 또는 수유부 13) 연구자가 본 연구에 참여하기에 부적절하다고 판단하는 경우
가능성 원료 시험 정보	시험기간 12주(84일)	대조군 위약정보 대우유 100%
가능성 평가지표	① 지질 수준 및 관련 대사 지표 - 중성지방, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, VLDL-콜레스테롤, Apo B100, Apo CIII, 혈당, 인슐린 ② 신체계측 - 체중, 허리둘레, 엉덩이둘레 등	
측정주기	2주, 6주	
통계분석 방법	intention-to-treat(ITT) 분석 또는 "per-protocol(PP)" 분석	
가능성 입증기준	혈중 중성지방 등 기능성지표가 대조군 대비 시험군에서 통계적으로 유의하게 개선된 경우	
모니터링 계획여부	있음 (CRO에 위탁)	
2018년 12월 14일		
신청인 (주)한국생활건강 (인) (인)		
식품의약품안전평가원장 귀하		
첨부서류	인체적용시험 계획서	

* RCT(Randomized control trial), DB(Double-blind)

(인체적용시험 사전검토 결과 알림)

국민의 나라 정다운 대한민국

식품의약품안전처

주소 (주)한국생활건강(대표자: 이정근) 귀하 (우04994 서울특별시 광진구 동일로 304 (군자동)) (경유)

제목 건강기능식품 인체적용시험 계획서 사전검토 결과 알림 [GUCO복합물(감초물추출물+MCT코코넛오일)]

1. 관련 : 영양기능연구팀-5528(2018.12.18.) 호

2. 귀사에서 우리 원에 제출한 '건강기능식품 인체적용시험 계획서 사전검토[원료명 : GUCO복합물(감초물추출물+MCT코코넛오일)]'에 대한 검토 결과는 아래와 같으며, 검토항목 이외의 항목(피험자 안전성)은 검토 제외되었음을 알려드립니다.

3. 참고로, 해당 검토결과는 '건강기능식품에 관한 법률'에 적용받지 않음을 알려드립니다.

순번	항목	검토결과
1	시험디자인	○ 타당
2	대상자 정보	○ 대상자 선정기준에서 '혈중 중성지방 수준 150 mg/dL 이상'에는 환자가 포함될 수 있으므로 환자가 제외될 수 있는 범위(상한치)를 명시 ○ 대상자는 특정집단이 아닌 일반적으로 적용 가능한 범위에서 선정을 고려하여야 함. 대상자에 가능한 한 흡연자가 포함되지 않도록 하고, 알코올 섭취 관련 제외기준에 대한 근거 재검토 필요 ○ 시험에 영향을 주지 않도록 의약품 또는 건강기능식품이 충분히 제거될 수 있는 휴약기간(wash-out period)을 고려하여 대상자 제외기준 설정 필요
3	시험기간 및 측정주기	○ 대조 및 시험물질의 맛, 향 및 성상이 구분되지 않도록 제조 ○ 대조식품은 신청 기능성에 영향을 미치지 않는 물질로 구성되어야 함 ○ 시험식품 구성(500 mg 캡슐에 신청원료 440 mg 함유)이 배합비율(신청원료로서 100%)과 상이하여 검토 필요
4	평가지표	○ 신청 기능성의 추측기전을 설명할 수 있는 기반연구(시험관, 동물시험)와 연관된 평가지표 선정 ○ 인체적용시험에서 '혈중 중성지방 개선' 기능성과 관련된 바이오마커로는 중성지방 수치의 개선이 가장 중요한 평가 지표임
5	통계처리	○ ANCOVA의 설정변수는 보정사유를 명확히 제시하고, 신청 기능성에 영향을 미치지 않는 범위로 설정

붙.





2018년 12월 14일

신청인 (주)한국생활건강 (인) (인)

식품의약품안전평가원장 귀하

식품의약품안전처

주무관 **국주희** 연구관 **권용만** 영양기능연구팀장 2018.12.18.

담당 **오금순**

시험 영양기능연구팀-412 (2019.1.28.) 접수

우 28159 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 / www.nfds.go.kr

전화번호 043-719-4430 팩스번호 043-719-4420 / kujh@korea.kr / 비공개(5,7)

일자리가 성장이고 복지입니다.

□ 기능성 원료 신청 검토 및 자료 준비

식약처의 혈중중성지방 개선 및 혈중 콜레스테롤 개선 기능성에 대한 기능성 원료(고시형, 개별인정형)를 조사한 결과 다음과 같았음. (식약처 식품안전나라 기준 개별 정리한 것임)

<고시형>

No.	원료명	원재료	기능성 카테고리	지표성분(기능성분)
1	EPA 및 DHA 함유 유지	식용 가능한 어류 및 조류(藻類), 바닷물범	혈중 중성지방 개선	EPA와 DHA의 합
2	감마리놀렌산 함유 유지	달맞이, 보라지, 까막까지밥종자	(혈중)콜레스테롤 개선	감마리놀렌산
3	구아검/구아검가수분해물	구아	(혈중)콜레스테롤 개선	식이섬유
4	귀리식이섬유	귀리겨	(혈중)콜레스테롤 개선	식이섬유
5	글루코만난(곤약, 곤약만난)	곤약의 뿌리줄기	(혈중)콜레스테롤 개선	식이섬유
6	난소화성말토덱스트린	옥수수전분	혈중 중성지방 개선	식이섬유
7	녹차추출물	녹차잎	(혈중)콜레스테롤 개선	카테킨
8	대두단백	대두	(혈중)콜레스테롤 개선	조단백질 + 다이드제인 + 제니스테인
9	대두식이섬유	대두	(혈중)콜레스테롤 개선	식이섬유
10	레시틴	대두, 난황	(혈중)콜레스테롤 개선	인지질(포스파티딜콜린)
11	마늘	마늘 구근	(혈중)콜레스테롤 개선	알리인(Alliin)
12	스피루리나	스피루리나속 조류(藻類)	(혈중)콜레스테롤 개선	총엽록소
13	식물스테롤/식물스테롤에스테르	대두유, 옥수수유, 채종유를 생산하는 공정 중 탈취공정 중에 생긴 증류물	(혈중)콜레스테롤 개선	식물스테롤에스테르 + 유리식물스테롤
14	옥수수겨식이섬유	옥수수 겨	(혈중)콜레스테롤 개선	식이섬유
15	이눌린/치커리 추출물	치커리 또는 기타 국화과 식물의 뿌리	(혈중)콜레스테롤 개선	식이섬유
16	차전자피식이섬유	차전자의 섬유	(혈중)콜레스테롤 개선	식이섬유
17	클로렐라	클로렐라속 조류(藻類)	(혈중)콜레스테롤 개선	총엽록소
18	키토산/키토올리고당	갑각류(게, 새우 등)의 껍질, 연체류(오징어, 갑오징어 등)의 뼈	(혈중)콜레스테롤 개선	키토산의 탈아세틸화도(당 사슬 중에 글루코사민 잔기 비율), 키토산(글루코사민으로 서) 키토올리고당
19	홍국	쌀, 홍국균	(혈중)콜레스테롤 개선	총 모나콜린K(활성형)

<개별인정형>

No.	원료명	기능성 카테고리	지표성분(기능성분)	인정번호(인정일)
1	글로빈 가수분해물	혈중 중성지방 개선		제2011-21호 (2011.09.14)
2	(식물성 유지) 디글리세라이드 함유유지	혈중 중성지방 개선	Diacylglyceride	제2009-21호 (2009.03.06)
3	정제오징어유	혈중 중성지방 개선	DHA와 EPA의 합	제2009-76호 (2009.09.09)
4	보리베타글루칸추출물	(혈중)콜레스테롤 개선	베타글루칸	제2009-73호 (2009.09.09)
5	보리베타글루칸추출물	(혈중)콜레스테롤 개선	베타글루칸	제2010-32호 (2010.07.08)
6	보이차추출물	(혈중)콜레스테롤 개선		제2009-17호 (2009.02.26)
7	보이차추출물	(혈중)콜레스테롤 개선		제2014-7호 (2014.2.19)
8	사탕수수 왁스 알코올	(혈중)콜레스테롤 개선	폴리코사놀	제2006-4호 (2006.04.03)
9	식물스타놀에스테르	(혈중)콜레스테롤 개선	식물스타놀 에스테르	제2006-11호 (2006.07.12)
10	식물스타놀에스테르	(혈중)콜레스테롤 개선		제2014-32호 (2014.7.17)
11	씨폴리놀 감태주정추출물	(혈중)콜레스테롤 개선		제2012-28호 (2012.10.19)
12	아마인	(혈중)콜레스테롤 개선		제2009-72호 (2009.08.10)
13	적포도발효농축액	(혈중)콜레스테롤 개선		제2014-30호 (2014.7.7)

14	홍국쌀	(혈중)콜레스테롤 개선	총 모나콜린K	제2009-19호 (2009.02.27)
15	창녕양파추출액	(혈중)콜레스테롤 개선		제2010-38호 (2010.09.06)
16	창녕양파추출액	(혈중)콜레스테롤 개선		제2016-11호 (2016.08.23)

(인체적용시험자료집)

Investigator's Brochure Version 1.0
Protocol No. GUCO

Confidential

인체적용시험자자료집
Investigator's Brochure
GUCO

Version Number: 1.0
Effective Date: 2019
인체적용시험의뢰자: ㈜한국생활건강

본 인체적용시험자자료집에 수록된 모든 정보는 기밀사항으로 인체적용시험 연구 참고 목적으로만 사용됩니다. ㈜한국생활건강의 서면 동의 없이 인체적용시험 연구와 무관한 대상에게 본 문서의 일부 또는 전부를 복제하거나 공개하는 행위를 금합니다.

Investigator's Brochure Version 1.0
Protocol No. GUCO

Confidential

Table of Contents

1. 서론 -----3
2. 인체적용시험용 건강기능식품의 개요 -----5
2.1. 개요 -----6
2.2. 구조결정, 물리화학적 및 생물학적 성질에 관한 자료 -----6
2.2.1. 원재료 -----6
2.2.2. 지표성분 -----6
2.2.3. 제조방법 -----8
2.2.4. GUCO 성분 및 함량 -----8
3. 기능성시험 자료 -----9
3.1. 고지혈증 동물모델에서의 혈중중성지방 개선 관련 효능시험 -----9
4. 안전성 시험자료 -----25
4.1. GUCO 원재료 섭취 근거 정보 -----25
4.1.1. 국내·외 인정·허가 현황 -----25
4.1.2. 국내·외 사용 현황 -----31
4.1.3. 기능성분 및 관련물질의 안전성(부작용, 독성 등) DB 검색 정보 -----37
4.1.4. 섭취량 평가정보 -----48
5. 참고문헌 -----50

차후, 인체적용시험이 완료 되는대로 식약처 기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드(민원인 안내서) 및 세부 제출자료 체크리스트를 참고하여 개별인정 신청 작업에 들어가고, 품목허가 신고를 위한 준비도 함께 진행하고자 함.

□ 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부분호	비고
1 제출자료 전체의 종합 요약본				
		<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
2 기원 개발경위, 국내·외 인정 및 사용연장 등에 관한 자료				
2.1	기원	<input type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외		
2.2	개발경위	<input type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외		
2.3	국내외 인정·허가 현황	<input type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외		
2.4	국내외 사용 현황	<input type="checkbox"/> 국내 <input type="checkbox"/> 국외		
3 제조방법 및 그에 관한 자료				
3.1	제조공정표 ※ 수입건강기능식품인 경우 제조회사(A) 발행한 자료	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
3.2	원재료부터 단위공정별 제조방법 설명	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
3.3	사용된 원료 첨가물이 식용 및 첨가물공전에 적합한지 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 (모두, 일부)		
3.4	주요공정별 기능성분(또는 지표성분) 합량변화	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
3.5	주요공정별 수율 변화	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
4 원료의 특성에 관한 자료				
4.1	원료를 특징지을 수 있는 성분, 물질 등	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
4.3	영양성분정보자료	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
5 기능성분(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료				
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거 ※ 기능성분 또는 지표성분의 시험성적서 및 분석자료 포함 + 여러 번(Lot)의 시험성적서	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오		
5.2	표준품 정보 (자사표준품의 경우 순도, 구조분석, 유효기간 등 정보 추가)	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 사상 표준품 <input type="checkbox"/> 국가 표준품		
5.3	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법 지시방법인 경우 별리대선 자료 추가)	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 제 시 방법 <input type="checkbox"/> 제 시 방법		

연번	제출자료	제출여부	첨부분호
6 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료			
6.1	유해물질 규격 항목(납, 카드뮴, 중아소, 총수은)의 규격 및 근거 ※ 유해물질 규격 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
6.2	유해물질 규격 미설정 항목(잔류농약)의 시험성적서 및 분석자료	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
6.3	필요시 추가 항목의 규격 및 근거 (예: 글프미아소, 미생물 등) ※ 추가 항목의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
6.4	유해물질(중금속, 잔류농약, 미생물 등)의 시험방법	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7 안전성에 관한 자료 (의사결정도 :)			
7.1	섭취근거 정보	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검색 정보	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.3	섭취할 평가 정보	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.4	인체적용시험 정보	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
7.5	독성시험 + GLP기관 확인 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 <input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오 (생식, 항암성, 면역, 발암성)	
8 기능성 내용 및 그에 관한 자료			
8.1	시험관시험	<input type="checkbox"/> 시험원료 (논문 편) + 시험기관	
8.2	동물시험	<input type="checkbox"/> 유사원료 (논문 편) <input type="checkbox"/> 시험원료 (논문 편) + 시험기관	
8.3	인체적용시험	<input type="checkbox"/> 시험원료 (논문 편) + 시험기관 <input type="checkbox"/> 시험원료 (논문 편) + 시험기관 <input type="checkbox"/> 시험원료 (논문 편) + 시험기관	
9 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료			
9.1	섭취할 및 근거	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
9.2	섭취방법 및 근거	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료			
10.1	건강기능식품에 사용할 수 없는 원료 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	
10.2	의약품과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	<input type="checkbox"/> 예 <input type="checkbox"/> 아니오	

(9) 혈중중성지방 개선 건강기능식품 시제품 개발 및 제품의 홍보, 마케팅 전략 수립

국내외 오메가3 관련 건강기능식품(혈중지질개선 기능)의 제품별로 보면, 타 제품별 가격 포함하여 중량 및 구성, 섭취량, 성분원료 등을 참고하여 최적의 가격을 도출하고, 개발제품 출시 이후 판매가 할인(온오프라인상) 및 점차적인 제품가격 인하를 통한 가격 경쟁력을 확보하고자 함.

구분	P사/그린체 오메가-3	C사/오메가3골든타임	U사/바이오메가(오메가-3)	J사/프리미엄 오메가3 프로메가
제품				
가격(원)	35,000 (500mg×60캡슐 기준)	19,000 (1000mg x 90캡슐)	40,000	23,900
중량 및 구성	33g(550mg×60캡슐) 1개월분	(1000mg x 90캡슐)	56캡슐	55.8g(930mg×60캡슐) 총 60일분
섭취량	1일 1회, 1회 2캡슐씩 총 30회 분량	1일 1캡슐	1회 2캡슐(1,061mg), 총 28회 분량	1일 1회, 1회 1캡슐씩
원재료/함량	오메가3지방산농축유지 100% (EPA+DHA 합 55%)	정제어유, 토코페롤 혼합형(캐나다산) 100%	정제어유, 천연레몬오일, D-토코페놀, 대두유, 옥수수유, 비타민D3	EPA 및 DHA 함유 유지: 정제어유 (EPA+DHA 65% 이상), d-토코페놀(혼합형), 해바라기유/캐나다산
영양(기능)성분	EPA+DHA 600mg	EPA+DHA 550mg	EPA 290mg + DHA 235mg	EPA+DHA 600mg
기타	1회분량: 2캡슐(1.1g) 기준, 열량 10kcal, 지방 1.1g (2%)	캡슐기재: 젤라틴, 정제수, 글리세린, 열량 10kcal, 지방 1g (2%)	열량 10kcal, 지방 1g (2%)	캡슐기재, 젤라틴, 글리세린, D-소르비톨액 열량 0kcal, 지방 1g

구분	웰메이드 슈퍼오메가3파워1100	NATURAL LIFE NUTRITION INC 프리미엄오메가-3 1100	SOLGAR Vitamin & Herb 오메가-3 700	경동제약 rTG 더오메가3
제품				
가격(원)	27,000	20,000	33,000	31,600 (120캡슐)
중량 및 구성	216g(1200mg×180캡슐)	216g(1202mg×180캡슐)	1200mg × 60캡슐 72g, 2개월분	34.2g(570mg×60캡슐)
섭취량	1일 1회, 1회 1캡슐씩	1일 1회, 1회 1캡슐씩	1일 1회, 1회 1캡슐씩	
원재료/함량	정제어유(멸치) 100%	정제어유(멸치)99.83%, 비타민E(d-알파토코페롤)	정제어유(멸치, 정어리)100% (EPA33.33%, DHA25%)	EPA 48%+DHA 32% 정제어유 99.51%, 비타민E
영양(기능)성분	EPA 700mg + DHA 400mg	EPA 745mg + DHA 355mg	EPA 400mg + DHA300mg	
기타	캡슐재질: 젤라틴(돈피), 글리세린, 정제수	캡슐기재: 젤라틴(돈피), 글리세린, 정제수	캡슐원료명: 돈피 젤라틴(돼지), 글리세린	

* 온라인상 판매되고 있는 제품별로 조사하여 정리한 것임

나. 국산감초와 코코넛오일의 혈중중성지방개선 최적비율확보와 원료의 표준화, 안정성평가 연구
[협동기관 1]

□ 코코넛오일과 국산감초비극성 추출물 확보 및 최적 효력비율 확보

(1) 코코넛오일을 이용한 감초추출물 확보

코코넛 오일에 감초를 넣고 60℃(저온에서는 굳는 성질이 있음)에서 24시간 침출로 추출함. 고형물과 오일을 분리 후 HPLC를 이용하여 감초 성분 추출함량을 확인하기 위하여 전처리 실시함. 전처리 방법으로

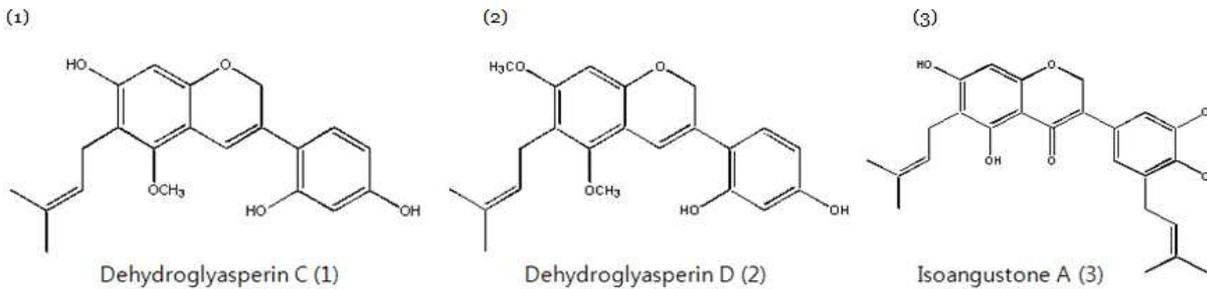
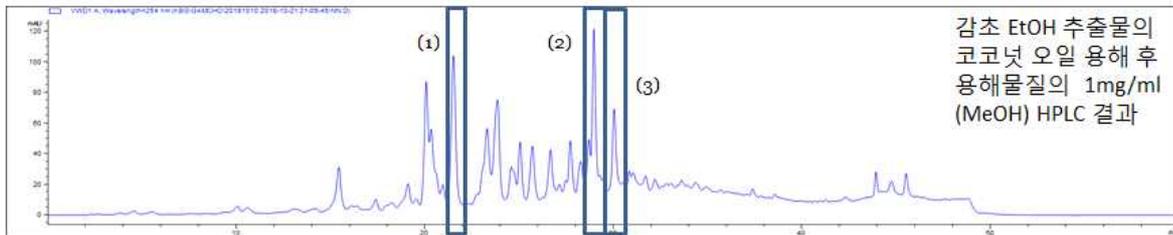
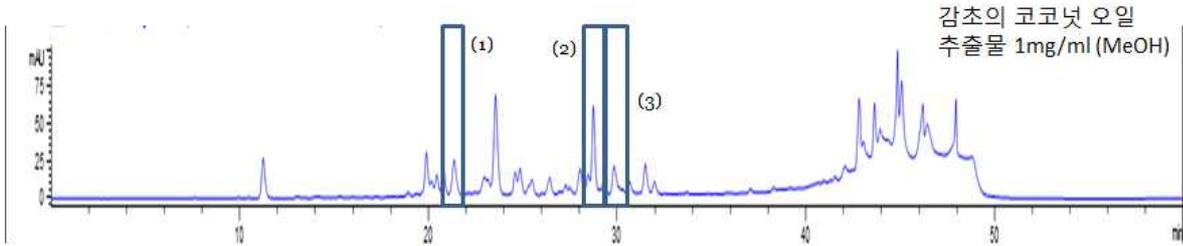
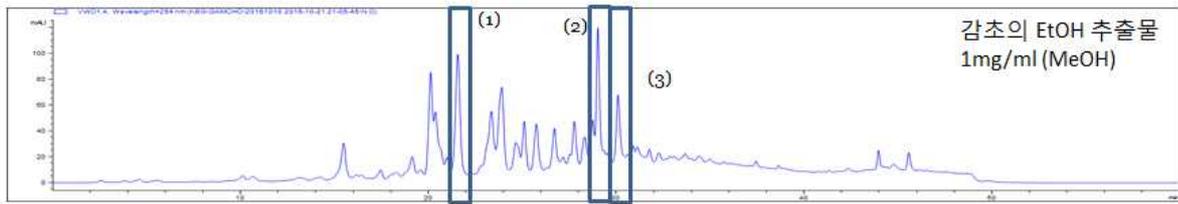
- ① 추출시료를 원심분리기로 3000rpm의 조건에서 15분 원심 분리하여 얻어진 침전물을 완전히 제거 후 상층액만 사용함
- ② 분획 깔때기에 동일한 양의 메탄올(Methanol)과 헥산(Hexan)을 넣어 2분간 섞어준 후 10분간 방치 하여 용매가 두개의 층으로 확연히 나누어졌을 때, 분획층의 상층과 하층에서 동일한 양(2 mL)의 용매를 취함
- ③ 원심분리 한 시료의 상층액(600 uL)을 2)의 바이알(vial)에 넣어 2분간 섞어줌
- ④ 완전히 분리된 바이알(vial)의 하층(메탄올 층) 중 1 mL를 취해 미리 무게가 측정된 1.5mL 튜브에 담아 감압농축하여 HPLC 분석을 통한 성분 함량을 확인함

(2) HPLC 기기 분석 조건

조건	분석사항
분석 조건	<ul style="list-style-type: none"> • HPLC : Agilent 1200 HPLC system • Column : Agilent Zorbax SB-C18 110A 4.6*150 mm (3.5um) • Temp : 30℃ • Flow rate : 0.7 mL/min • Injection volume : 10 uL • Detector : Diode-Array detector (UV=254 nm) • Solvent : A : 0.1% Trifluoroacetic acid in water B : Acetonitrile

Time	% A Water (+0.1% TFA)	% B Acetonitrile
10	85	15
10	50	50
15	45	55
25	65	35
35	40	60
40	0	100
45	0	100
47	85	15
50	85	15

(3) 감초추출물, 코코넛오일을 용매로 사용하여 용출된 감초추출물, 감초 EtOH추출물의 코코넛 오일 용해물의 HPLC 패턴 분석 및 수율과 용해도 비교 분석



<그림> 추출 용액에 따른 성분 추출 패턴 HPLC 그래프

<표> 코코넛오일을 용매로 사용하여 용출한 감초 추출물의 수율

Number	감초와 코코넛오일 비율	추출량(mg/ml)	수율 (%)
1	600 mg/ml	13.84	2.3 (%)
2	300 mg/ml	8.35	2.94 (%)
3	100 mg/ml	1.84	1.84 (%)

<표> 감초에탄올추출물과 코코넛오일 첨가 시 용해도 평가

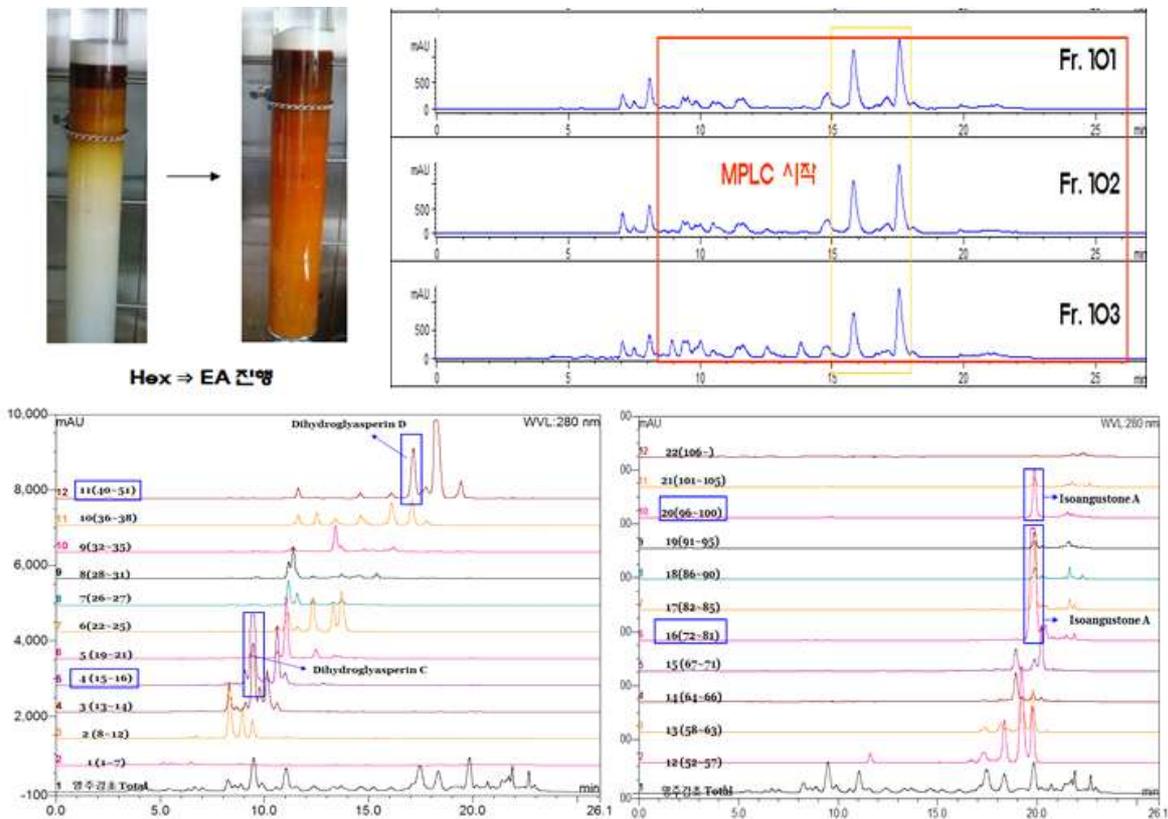
Number	감초에탄올 추출물과 코코넛오일 비율	상태
1	1 mg/ml	완전 용해(o)
2	3 mg/ml	용해(x)
3	5 mg/ml	용해(x)

- 감초에탄올추출물, 코코넛오일을 용매로 사용하여 용출한 감초 추출물, 감초에탄올추출물의 코코넛오일 추출물의 HPLC 패턴 분석 결과 동일한 성분이 추출되는 것이 확인되었으며, 반면 감초에탄올추출물의 코코넛오일 추출물은 용해도 상태가 좋지 않음을 확인함.
- 따라서 코코넛오일을 용매로 사용하여 용출한 감초 추출물로 선정함.(비극성 추출물)
- 코코넛오일을 용매로 사용하여 용출한 감초 추출물, 감초 비극성 추출물, 선플라워 오일, 코코넛 오일 시료를 2협동에 전달함.

□ 기능성 원료의 지표성분 분리

(1) 지표 성분 분리

- ① 영주감초 비극성추출물을 확보하기 위하여 Hex:EtOH=9:1추출물하여 SiO₂ column으로 분리 하였으며, 이동상 용매로는 헥산(Hexan) 100%에서 ethyl acetate 100%으로 극성을 높여주면서 분리함.
- ② 125개의 fraction을 얻어 매일 피크를 포함하는 fractiondmf 그룹화하여 MPLC 실시함.



<그림> 지표 성분 분리 방법

(2) 구조 규명

Dehydroglyasperin C (1) C₂₁H₂₂O₅; ¹H-NMR, (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 1.62 (3 H, s, H-5[“]), 1.70 (3 H, s, H-4[“]), 3.14 (2 H, d, *J*=6.54, H-1[“]), 3.67 (3 H, s, OCH₃-5), 4.83 (2 H, s, CH₂-2), 5.13 (1 H, t-like, H-2[“]), 6.14 (1 H, s, H-8), 6.25 (1 H, dd, *J*=8.3, 2.4, H-5[’]), 6.32 (1 H, s, *J*=2.4, H-3[’]), 6.64 (1 H, s, H-4), 7.04 (1 H, d, *J*=8.3, H-6[’]), 9.39 (1 H, s, OH-4), 9.54 (1 H, s, OH-7),

9.60 (1 H, s, OH-2'); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 18.12 (C-4"), 22.61 (C-1"), 25.94 (C-5"), 62.10 (C-5, OCH₃), 67.73 (C-2, CH₂), 98.89 (C-8), 103.18 (C-3'), 107.30 (C-5'), 109.21 (C-4a), 114.36 (C-6), 115.06 (C-4), 117.02 (C-1'), 124.37 (C-2"), 127.97 (C-3), 129.12 (C-6'), 129.95 (C-3"), 152.74 (C-8a), 155.38 (C-5), 156.24 (C-7), 156.57 (C-2'), 158.46 (C-4').

Dehydroglyasperin D (2) C₂₂H₂₄O₅; ^1H -NMR, (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.68 (3 H, s, H-5"), 1.76 (3 H, s, H-4"), 3.23 (2 H, d, $J=6.85$, H-1"), 3.73 (3 H, s, OCH₃-5), 3.80 (3 H, s, OCH₃-7), 4.95 (1 H, s, CH₂-2), 5.14 (1 H, t-like, H-2"), 6.31 (1 H, dd, $J=8.37, 2.4$, H-5'), 6.38 (1 H, s, H-8), 6.40 (1 H, s, $J=2.4$, H-3'), 6.74 (1 H, s, H-4), 7.12 (1 H, d, $J=8.37$, H-6'), 9.47 (1 H, s, OH-4'), 9.69 (1 H, s, OH-2'); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 18.08 (C-4"), 22.53 (C-1"), 25.94 (C-5"), 56.19 (C-7, OCH₃), 62.22 (C-5, OCH₃), 67.80 (C-2, CH₂), 95.75 (C-8), 103.25 (C-3'), 107.36 (C-5'), 114.67 (C-4), 115.53 (C-6), 116.71 (C-1'), 124.00 (C-2"), 128.71 (C-3), 129.20 (C-6'), 130.40 (C-3"), 153.16 (C-8a), 154.88 (C-5), 156.53 (C-2'), 157.99 (C-7), 158.45 (C-4')

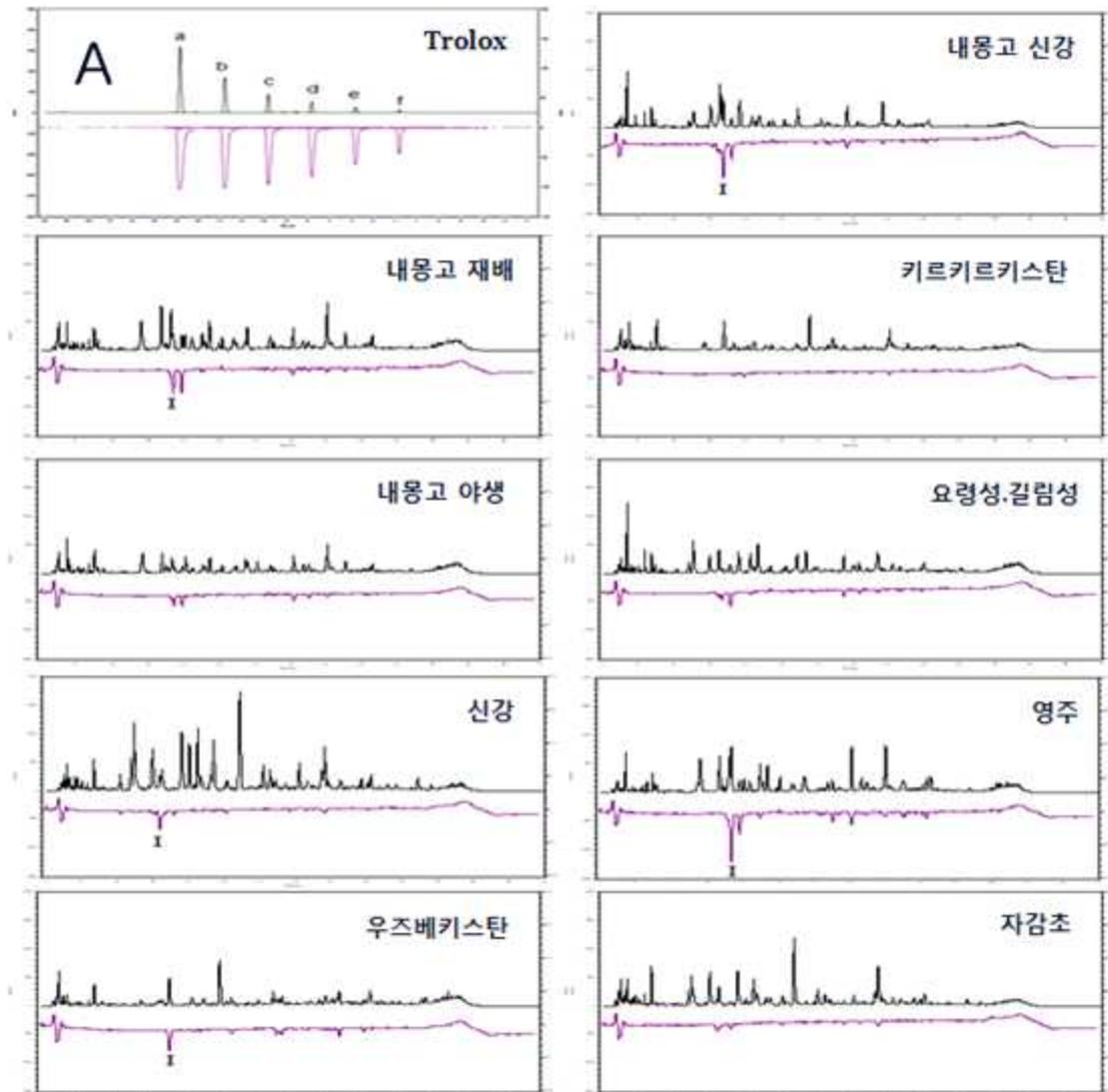
Isoangustone A (3) C₂₅H₂₆O₆; ^1H -NMR, (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.62 (3 H, s, H-5"), 1.69 (6 H, s, H-4", 5"), 1.72 (3 H, s, H-4"), 3.23 (4 H, s, CH₂, 1" and 1"), 5.17 (1 H, t, H-2"), 5.28 (1 H, t, H-2"), 6.44 (1 H, s, H-8), 6.66 (1 H, d, $J=1.2$, H-6'), 6.88 (1 H, s, $J=1.2$, H-2'), 8.26 (1 H, s, H-2), 8.36, 9.36, 10.86 (each, 1 H, H, OH-3', 4', 7), 13.28 (OH-5); ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 18.16 (C-4", 4"), 21.50 (C-1"), 25.95 (C-5"), 26.01 (C-5"), 28.75 (C-1"), 93.31 (C-8), 104.72 (C-4a), 111.42 (C-6), 114.46 (C-2'), 120.91 (C-6'), 122.55 (C-3), 122.63 (C-2"), 122.99 (C-1'), 123.50 (C-2"), 128.41 (C-5'), 131.15 (C-3"), 131.37 (C-3"), 143.58 (C-4'), 144.94 (C-3'), 154.11 (C-2), 155.75 (C-8a), 159.27 (C-5), 162.38 (C-7), 180.77 (C-4).

- 영주 감초의 지표성분 Dihydroglyasperin C, Dihydroglyasperin D, Isoangustone A 확보

□ 원재료 표준화

(1) 지역별 감초 향산화성분의 표준화 확립

내몽고의 신강산(I: Monggo Shingang), 내몽고 재배(II: Monggo Cultivated), 키르기스스탄공화국의 키르기스스탄산(III: Kyrgyzstan), 내몽고의 야생(IV: Monggo Wild), 중국의 요령성·길림성산(V: Yoryungseong · gilymseong), 중국의 신강산(VI: Shingang), 경북 영주에서 재배한 영주산(VII: Youngju), 우즈베키스탄공화국의 우즈베키스탄산(VIII: Uzbekistan), 중국 신강의 자감초(IX: Jagamcho)



<그림> 지역별 감초 향산화성분의 표준화 확립

<표> Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC)로 ABTS radical로 확인된 활성물질 확인

Samples	Sum of negative peaks	TEAC of negative all peaks	Sum of peak I, II, III	TEAC of majors		
	(734 nm, mAU)			I	II	III
내몽고 신강	1.34x10 ⁶	0.36	8.59x10 ⁵	1.08	0.58	0.38
내몽고 재배	1.15x10 ⁶	0.29	6.61x10 ⁵	0.81	0.41	0.47
키르키르키스탄	3.67x10 ⁵	0.09	1.74x10 ⁵	0.10	0.06	0.27
내몽고 야생	8.11x10 ⁵	0.21	3.93x10 ⁵	0.18	0.42	0.34
요령성-길림성	9.71x10 ⁵	0.23	3.22x10 ⁵	0.22	0.34	0.19
신강	6.16x10 ⁵	0.15	2.46x10 ⁵	0.20	-	0.39
영주	2.12x10⁶	0.47	1.08x10⁶	1.09	0.85	0.44
우즈베키스탄	8.20x10 ⁵	0.19	2.84x10 ⁵	0.65	-	-
자감초	6.24x10 ⁵	0.15	3.18x10 ⁵	0.25	0.07	0.44

- 식물종 및 재배지역 : 경북 영주
- 사용 재배 년 수는 1~2년생으로 출하 시기는 11월에 이루어짐.
- 시료양(1kg)/ EtOH 추출 시에 34.8g 얻어지며, 3.48% 수율로 확인이 됨.

□ 반응표면분석을 이용한 최적의 추출조건 확립 - 혼합 비율 도출

(1) 반응표면분석법(Response Surface methodology, RSM) 실험 계획

중심합성계획에서 독립(조건)변수로는 시료와 추출용매 비율 (100-600 mg/mL), 추출 온도 (40-60°C), 추출시간 (2-12hr)으로 -2, -1, 0, 1, 2의 총 5단계로 부호화하여 추출함.

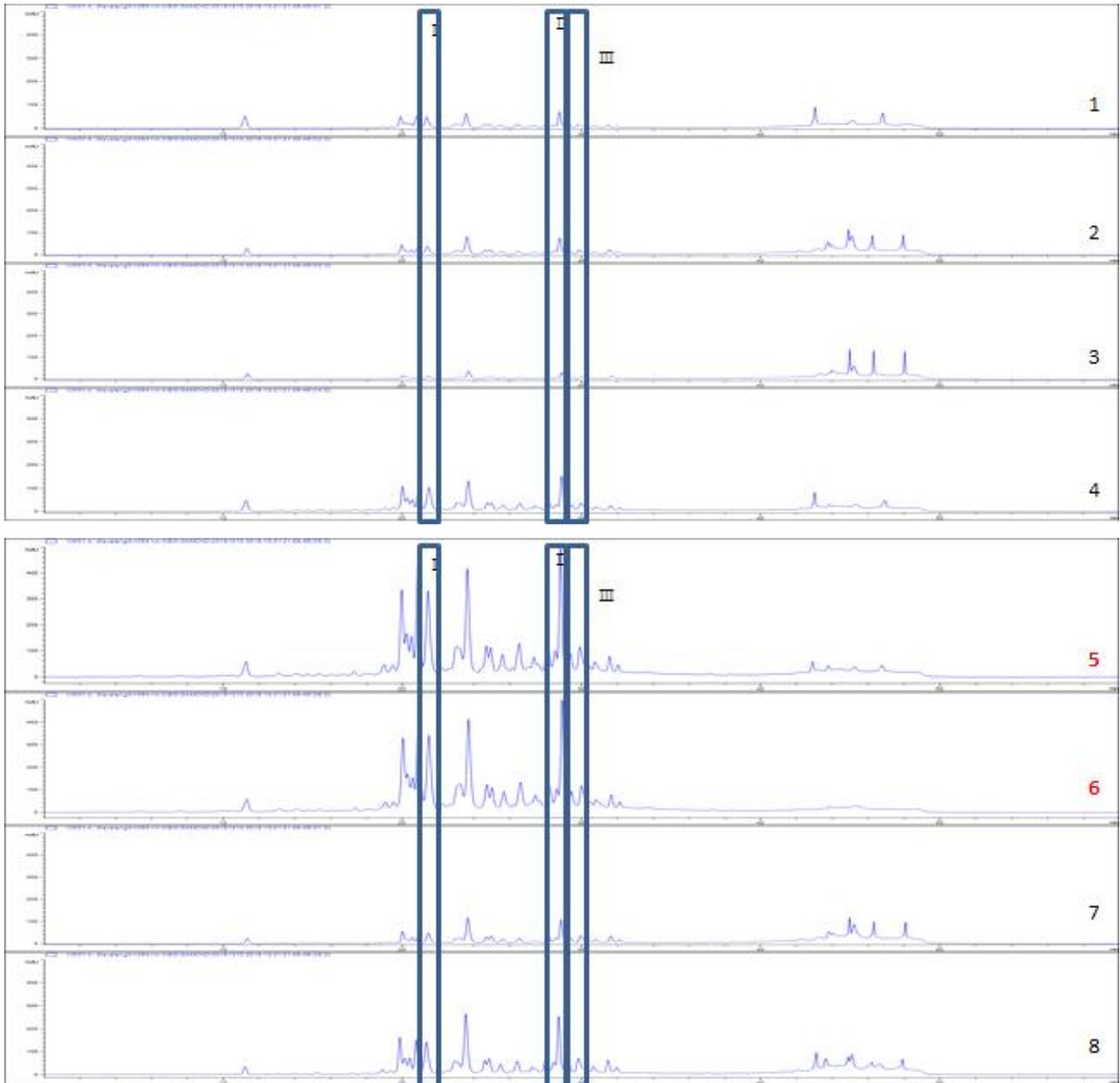
<표> 코코넛오일을 용매로 사용하여 용출한 감초 추출물의 최적추출을 위한 반응표면분석 조건

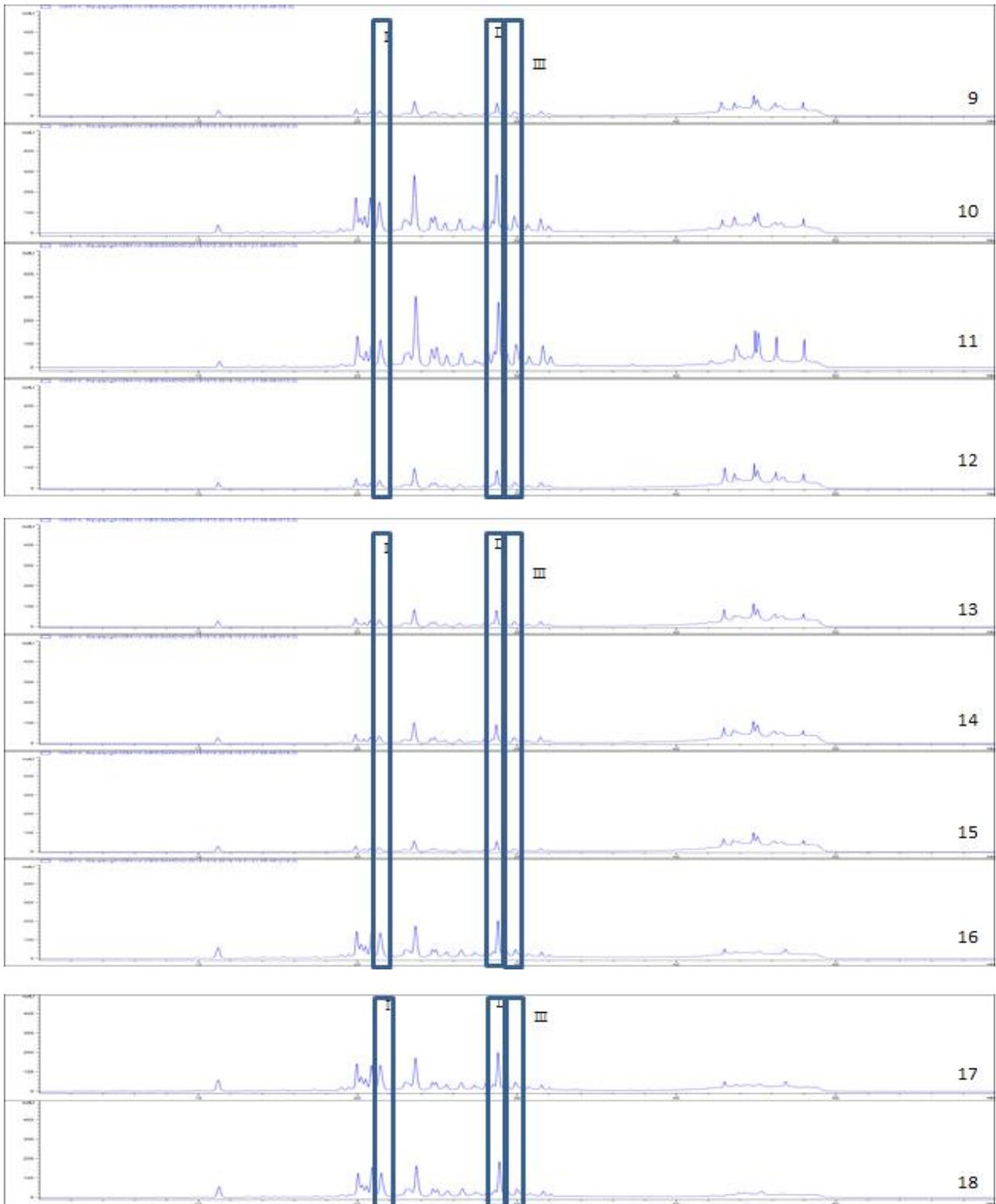
Independent variabel	Symbol code	Coded level				
		-2	-1	0	1	2
Ratio(mg/ml)	X ₁	100mg/ml	200mg/ml	300mg/ml	500mg/ml	600mg/ml
Temperature(°C)	X ₂	40	50	60	70	80
Time(hr)	X ₃	2	4	8	10	12

<표> 최적추출조건을 위한 반응표면분석과 이에 대한 활성 비극성 물질 함량, 수율, 항산화능 결과

X ₁ (Ratio)	X ₂ (°C)	X ₃ (hr)	Dihydroglyasper in C (AU)	Dihydroglyasperin D (AU)	Isoangustone A (AU)	Total	Yield (%)	Inhibition (%)
200mg/ml (-1)	40 (-1)	4 (-1)	660	689.9	202.8	1,552.7	1.14	59.65
200mg/ml (-1)	40 (-1)	12 (+1)	538.7	761.4	335.6	1,635.7	1.21	29.31
200mg/ml (-1)	80 (+1)	4 (-1)	198.3	318	150.4	666.7	1.49	31.47
200mg/ml (-1)	80 (+1)	12 (+1)	1470.4	1501.5	440.1	3,412	2.22	47.79
500mg/ml (+1)	40 (-1)	4 (-1)	4538.5	4886.6	1354.7	10,779.8	2.18	79.77
500mg/ml (+1)	40 (-1)	12 (+1)	4611	5043.8	1353.8	11,008.6	2.25	80.34
500mg/ml (+1)	80 (+1)	4 (-1)	657.2	1089.8	499.2	2,246.2	1.66	43.89
500mg/ml (+1)	80 (+1)	12 (+1)	2034.7	2533.5	962.8	5,531	1.93	56.7
100mg/ml (-2)	50 (0)	8 (0)	349.8	604.9	290.5	1,245.2	0.34	22.8
600mg/ml (+2)	50 (0)	8 (0)	2143.6	2879.1	1105	6,127.7	1.51	63.9
300mg/ml (0)	30 (-2)	8 (0)	1619.3	2906	1461.2	5,986.5	1.38	80.4
300mg/ml (0)	70 (+2)	8 (0)	548.4	875	413.6	1,837	2.1	59.09
300mg/ml (0)	60 (0)	2 (-2)	467.9	792	336.6	1,596.5	0.78	46.66
300mg/ml (0)	60 (0)	12 (+2)	514.4	890.5	426.2	1,831.1	2.58	24.95
300mg/ml (0)	60 (0)	8 (0)	309.7	515.6	241	1,066.3	2.52	28.90
300mg/ml (0)	60 (0)	8 (0)	1942.3	1958	511.2	4,411.5	2.17	24.38
300mg/ml (0)	60 (0)	8 (0)	962.9	1036.6	314.5	2,314	2.14	37.93
300mg/ml (0)	60 (0)	8 (0)	1708.1	1837.7	555.1	4,100.9	2.31	31.62

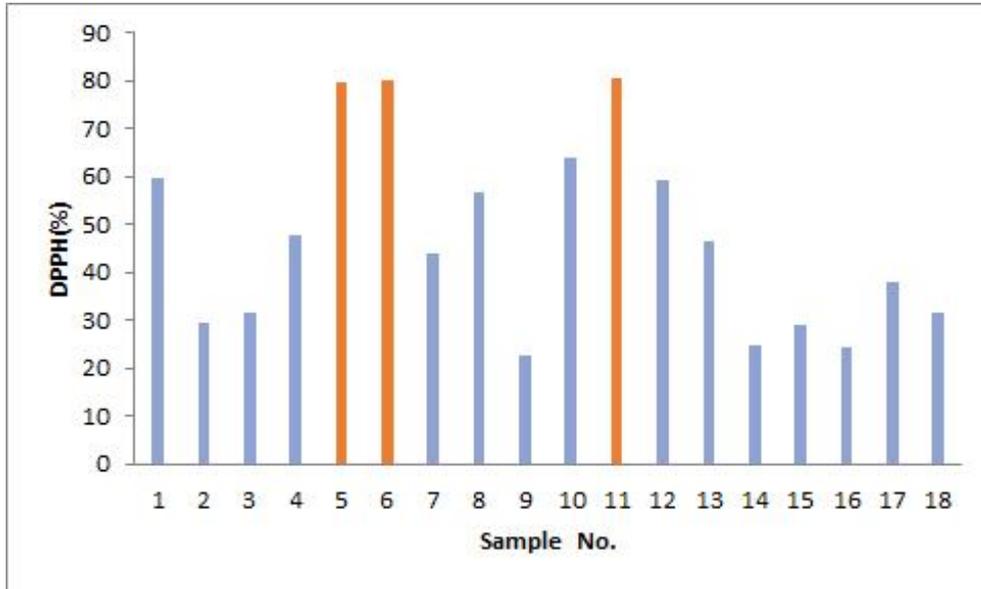
또한, 배합물의 품질특성에 관련된 종속(반응)변수로서 비극성 물질 함량(Dihydroglyasperin C, Dihydroglyasperin D, Isoangustone A), 수율, 항산화 효과인 DPPH 저해율(%)로 하였으며, 회귀 분석에 사용함. 회귀분석에 의한 최적조건의 예측은 Statistical Analysis System(SAS version 9.1) program을 이용 통계처리 함으로 추출 시 영향이 큰 조건과 추출 조건들의 관계 및 최적 추출 조건의 예상치를 확인함.





〈그림〉 반응표면분석 18개 추출물의 감초 비극성물질 HPLC 그래프

- 조건 5, 6에서 비극성 활성 물질인 Dihydroglyasperin C, Dihydroglyasperin D, Isoangustone A의 함량이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있으며, 수율 또한 높게 나타나는 것을 확인함.
- 반응표면분석(RSM) 18개 추출물의 DPPH 활성결과에서도 조건 5, 6, 11에서 항산화능이 높게 나타남을 확인함.



<그림> 반응표면분석 18개 추출물의 DPPH 활성

(2) 통계프로그램(SAS)를 이용한 결과

코코넛 오일을 용매로 하여 감초 추출 시 요인변수에 영향을 받는 종속변수인 수율(%), 비극성 활성물질 함량(AU), 항산화능(%) 값의 신뢰성을 나타내었음. 이 결과를 반응표면모델식(response surface model equation)으로 표현했을 때의 R²는 수율의 경우 0.6626, 비극성 활성물질 함량의 경우 0.8365, 항산화능의 경우 0.7798로 반응모형이 적합한 것으로 나타났으며, 수율에 대한 유의성은 10% 이내에서 인정되었고, 반응표면분석을 통한 감초의 추출 조건에 관한 다항식을 나타냄.

<표> 반응표면분석을 통한 감초의 추출 조건에 관한 다항식

Response variables	Second order polynomial equations ¹⁾	R ²	Significance
yield (%)	$Y=0.010850X_1-0.165583X_2-0.027850X_3+1.9108752E-8X_1X_1-0.000147X_2X_1+0.001320X_2X_2-0.000158X_1X_3+0.004469X_2X_3-0.007203X_3X_3$	0.6626	0.2223
Total non-polar content (AU)	$Y=43.856984X_1-323.459552X_2-515.653746X_3-0.004496X_1X_1-0.488184X_2X_1+2.898869X_2X_2+0.219471X_1X_3+8.934844X_2X_3+4.15118X_3X_3$	0.8365	0.0221
Antioxidant activity (%)	$Y=-0.184027X_1+2.402712X_2+1.572138X_3-0.000135X_1X_1+0.001363X_2X_1+0.045408X_2X_2+0.028946X_1X_3-0.309797X_2X_3+4.56479X_3X_3$	0.7798	0.0605

¹⁾ X₁, 시료와 에탄올의 추출용매 비율 (100-600 mg/mL); X₂, 추출 온도 (40-60°C); X₃, 추출시간 (2-12hr)

<표> 감초 추출 조건의 화학, 물리적 회귀 모형 분석

Extraction conditions	F-ratio		
	X ₁ ¹⁾	X ₂ ²⁾	X ₃ ³⁾
Yield (%)	1.03	3.00	0.96
Total non-polar contents (Au)	3.74	4.21	0.65
Antioxidant activity (%)	3.32	3.78	1.49

¹⁾ X₁, 시료와 에탄올의 추출용매 비율 (100-600 mg/mL); X₂, 추출 온도 (40-60℃); X₃, 추출시간 (2-12hr)

감초의 추출 조건에 대한 화학, 물리적 회귀모델에 대한 회귀분석을 나타낸 것으로, F-ratio는 추출 시 가장 영향을 많이 주는 인자들의 비율을 의미하며, 수율 및 비극성 물질을 대상으로 하는 추출 시 추출 온도가 영향이 큼을 알 수 있었음.

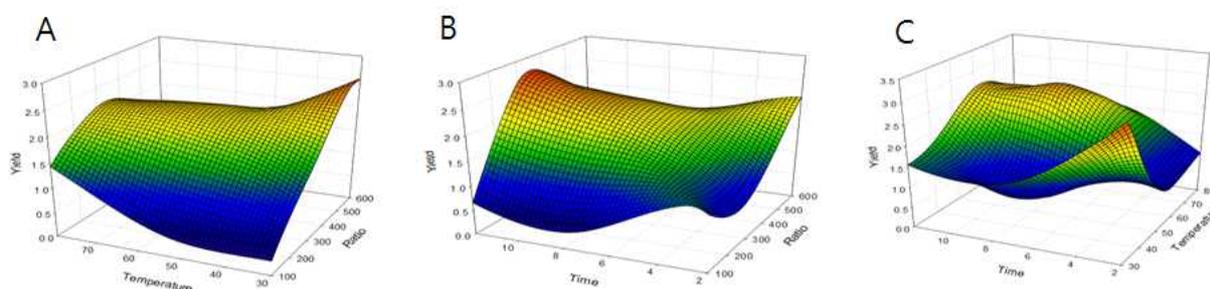
<표> 추출 조건의 최대 반응에 대한 추출 조건의 예상치 및 모형 분석

Response	Independent variables ¹⁾			Predicted value	Morphology
	X ₁	X ₂	X ₃		
extract yield (%)	449.5	61.3	6.60	3.56 (%)	Saddle point
Total polyphenol contents (Au)	503.68	63.3	6.91	10669 (Au)	Saddle point
Antioxidant activity (%)	415.85	86.09	9.37	89.19 (%)	Saddle point

¹⁾ X₁, 시료와 에탄올의 추출용매 비율 (100-600 mg/mL); X₂, 추출 온도 (40-60℃); X₃, 추출시간 (2-12hr)

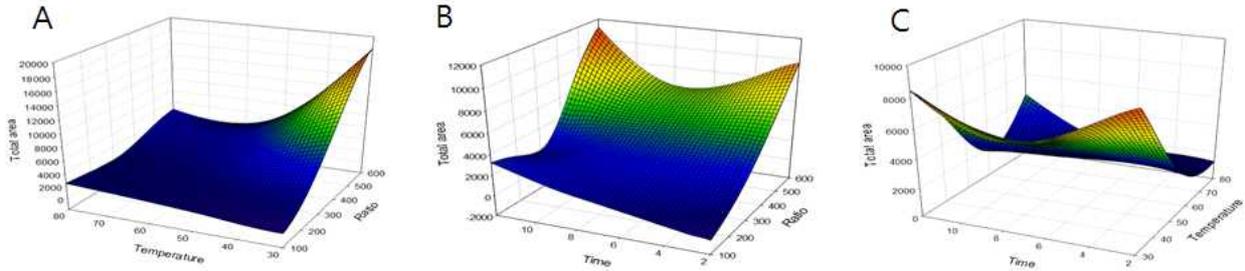
통계프로그램을 활용한 최적 추출 조건 예측치 결과, 예측된 정상점은 안장점(Saddle point)으로 확인되었고, 수율 3.56%, 전체 비극성 추출(면적) 10,669(AUC), 항산화 작용 89.1%의 우수한 감초추출물을 얻기 위해서는 코코넛오일에 감초의 비율을 415~503 mg/mL, 추출 온도 61.3~86 ℃, 추출 시간 6.6~9.3 시간으로 추출 조건이 확보되었음을 확인함.

(3) 추출 조건의 최대 반응에 대한 추출 조건의 예상치 및 모형 분석



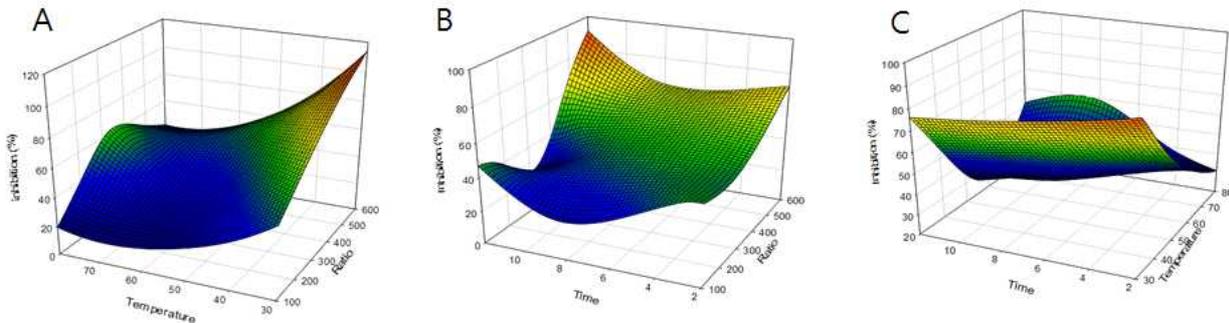
<그림> 추출 조건의 시료와 용매 비율, 추출 온도, 추출시간에 따른 수율에 관한 3차원 그래프

이 결과는 추출 조건에 따른 반응 표면분석으로 (A)시료-용매 비율, 추출 온도와 수율의 그래프 (B)시료-용매 비율, 추출 시간과 수율의 그래프 (C) 추출 시간, 추출 온도와 수율의 그래프로 반응표면모델식으로 표현했을 때의 회귀식 R²값은 0.6626로 예측된 정상점은 안장점이고, 시료와 용매 비율 449.5 mg/mL, 추출 온도 61.3°C, 추출시간 6.6hr 일 때, 3.56%의 가장 높은 수율이 나타남.



〈그림〉 추출 조건의 시료와 비율, 추출 온도, 추출시간에 따른 비극성물질의 함량에 관한 3차원 그래프

이 결과는 추출 조건에 따른 반응 표면분석으로 (A)시료-용매 비율, 추출 온도와 비극성 물질의 함량의 그래프 (B)시료-용매 비율, 추출 시간과 비극성 물질의 함량의 그래프 (C) 추출 시간, 추출 온도와 비극성 물질의 함량의 그래프로 반응표면모델식으로 표현했을 때의 회귀식 R² 값은 0.8365로 예측된 정상점은 안장점이고, 시료와 용매 비율 503.68 mg/mL, 추출 온도 63.3°C, 추출시간 6.91hr 일 때, 10669 (Au)의 가장 많은 비극성물질이 나타남.



〈그림〉 추출 조건의 시료와 비율, 추출 온도, 추출시간에 따른 전자공여능에 관한 3차원 그래프

이 결과는 추출 조건에 따른 반응 표면분석으로 (A)시료-용매 비율, 추출 온도와 전자공여능의 그래프 (B)시료-용매 비율, 추출 시간과 전자공여능의 그래프 (C) 추출 시간, 추출 온도와 전자공여능의 그래프로 반응표면모델식으로 표현했을 때의 회귀식 R²값은 0.7798로 예측된 정상점은 안장점이고, 시료와 용매 비율 415.85 mg/mL, 추출 온도 86.09°C, 추출시간 9.37hr 일 때, 89.19 (%)의 가장 높은 항산화능으로 나타남.

(4) 최대로 얻을 수 있는 예상치 수준과 실제치 수준

<표> 최대로 얻을 수 있는 예상치 수준과 실제치 수준

Response	Independent variables ¹⁾			예상치 수준	실제치 수준
	X ₁	X ₂	X ₃		
extract yield (%)	449.5	61.3	6.60	3.56 (%)	3.18 %)
Total polyphenol contents (Au)	503.68	63.3	6.91	10669 (Au)	10136 (Au)
Antioxidant activity (%)	415.85	86.09	9.37	89.19 (%)	83.11 (%)

¹⁾ X₁, 시료와 에탄올의 추출용매 비율 (100-600 mg/mL); X₂, 추출 온도 (40-60°C); X₃, 추출시간 (2-12hr)

수율의 반응표면분석을 통해 알게 된 최적화 된 조건의 예상치는 3.56%였고 실제치로는 3.18%로 비슷한 결과를 확인함.

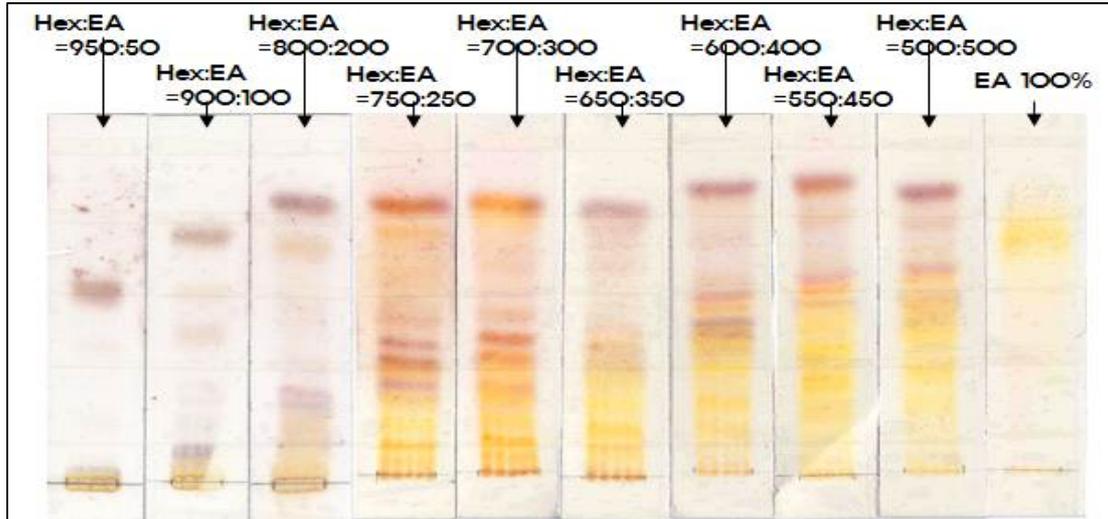
비극성 물질의 함량은 반응표면분석을 통해 알게 된 최적화 된 조건의 예상치는 10669(Au)였고, 실제치로는 10136%로 비슷한 결과를 확인함.

항산화 활성(%)은 반응표면분석을 통해 알게 된 최적화 된 조건의 예상치는 89.19%였고, 실제치로는 83.11%로 비슷한 결과를 확인함.

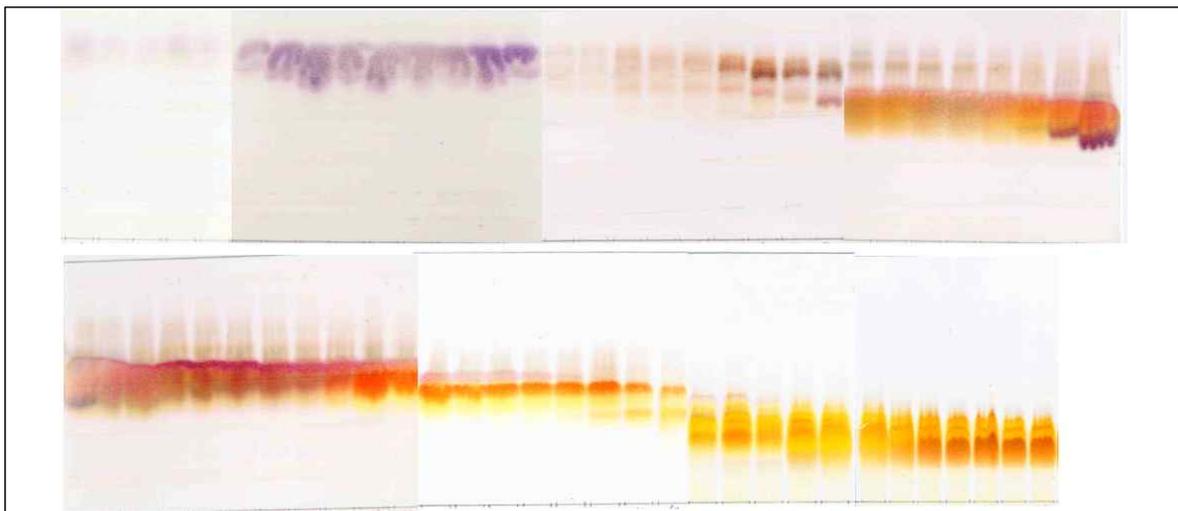
□ 유효물질(기능성분)의 분리, 정제 및 구조 규명

(1) 감초 추출물 및 분리

건조시킨 감초로부터 Hexane:methylene chloride(9:1)를 용매로 추출함. 이후에 이를 대상으로 SiO₂ 컬럼크로마토그래피를 n-hexane과 ethylacetate용매를 비율별로 혼합하여 극성별 분획 및 분리/정제 과정을 반복함. 헥산(Hexan) : ethyl acetate 용매 비율에 따라 용출되는 물질 확인은 TLC로 확인하였고, 전개용매는 Hex:EA=5:3으로 실시함.



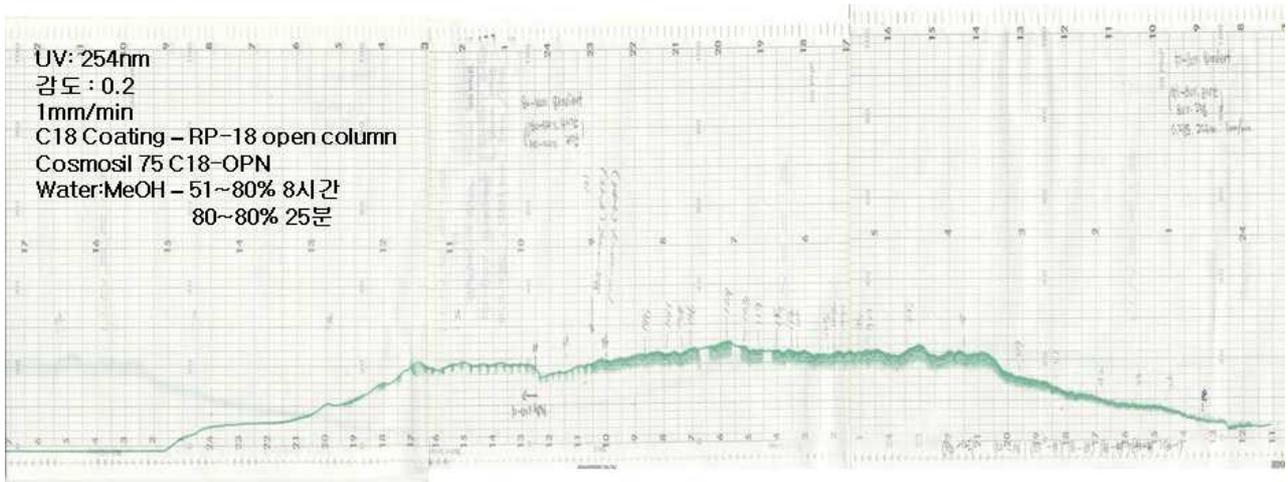
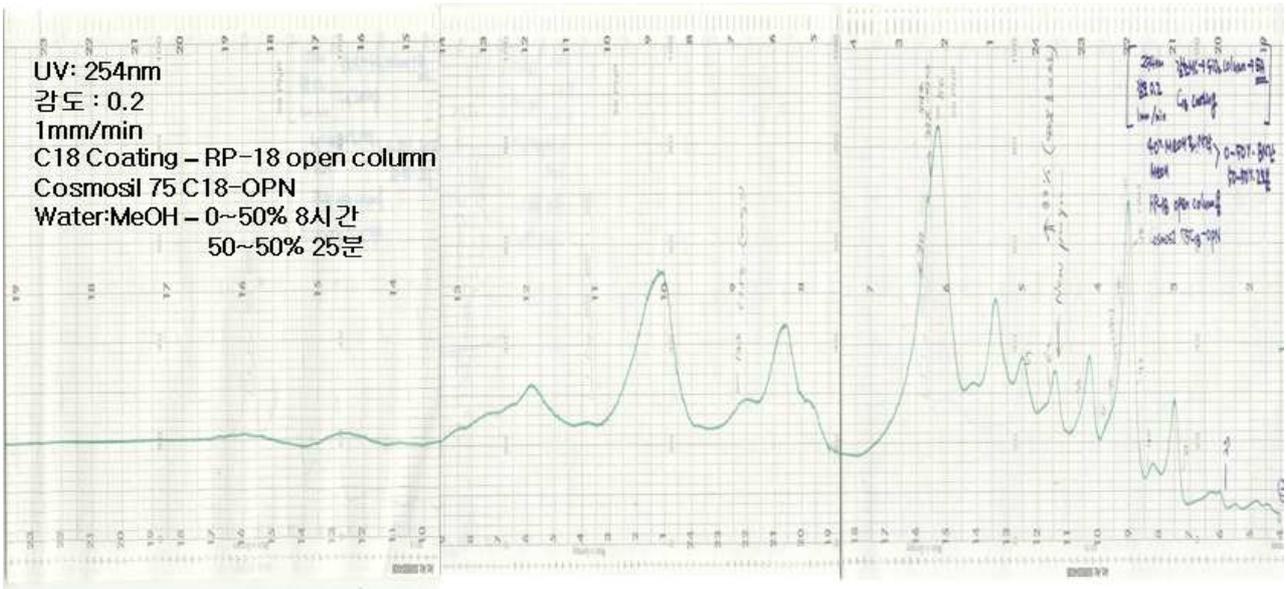
<그림> 용매 비율에 따른 컬럼 용출 변화



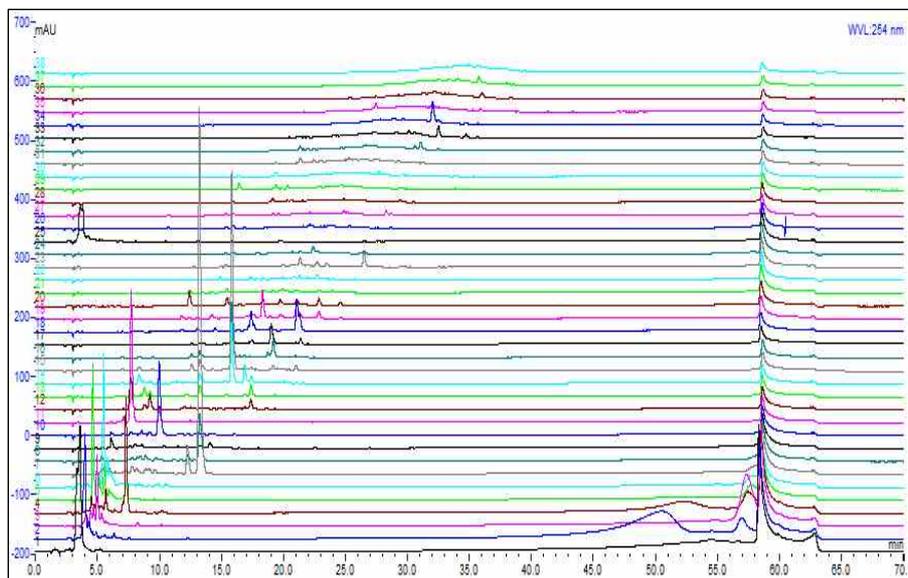
<그림> 영주 감초 추출물에서 분획물의 TLC 크로마토그래피(전개용매=Hex:EA=5:3)

물질 패턴이 양상에 따라 나눈 후 Medium pressure liquid chromatography Cosmosil 75 C18-OPN으로 Water:MeOH=0~80%, 254nm 측정하여 크로마토그래프를 얻음.

11개의 화합물을 확보하였고 이들 성분을 대상으로 아래와 같은 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, EI-MS 등 기기분석을 통하여 화학구조를 확인 규명함.



<그림> 영주 감초의 MPLC 물질 양상(254nm) 크로마토그래피



<그림> 영주 감초의 물질 양상 HPLC 크로마토그래피

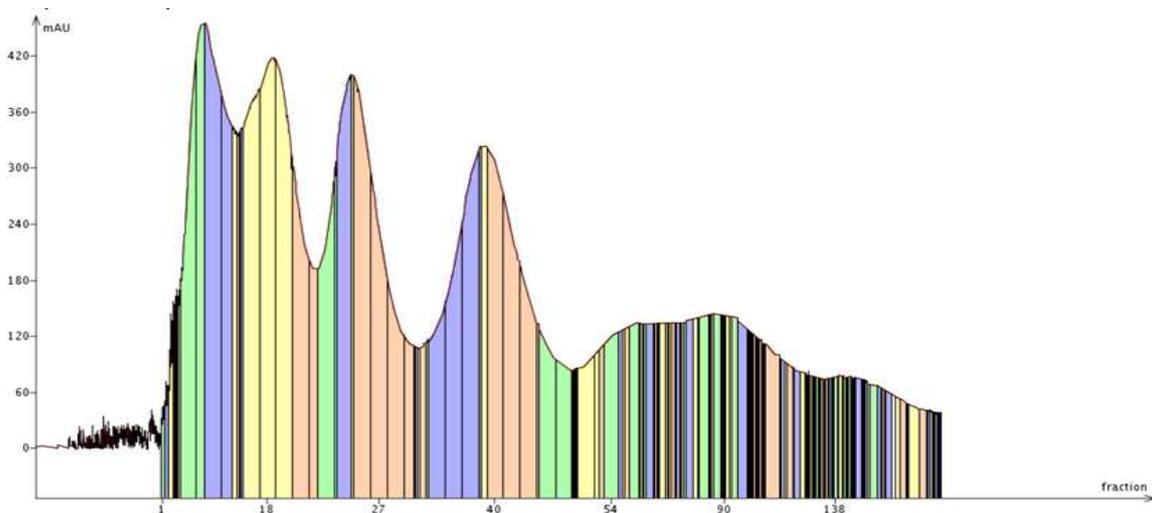
(2) HSCCC를 이용한 분리방법

용매조성별 감초 추출물의 분배계수에 따른 적합한 용매시스템은 Hexane-Ethylacetate-Methanol-water (6.5 : 6.5 : 6 : 4, v/v/v/v)로 결정되었으며, HSCCC의 작동조건은 Hexane-Ethyl acetate-Methanol-water 용매시스템의 하층부를 이동상으로 한 head to tail mode에서 이동상의 유속 5 mL/min, 감초추출물 injection량 700mg/50ml, 컬럼 회전 속도 400 rpm의 조건으로 실시하였고, 검출되어진 것은 254nm 측정하여 크로마토그래프를 얻음. HPLC 분석은 아래의 조건으로 실시함.

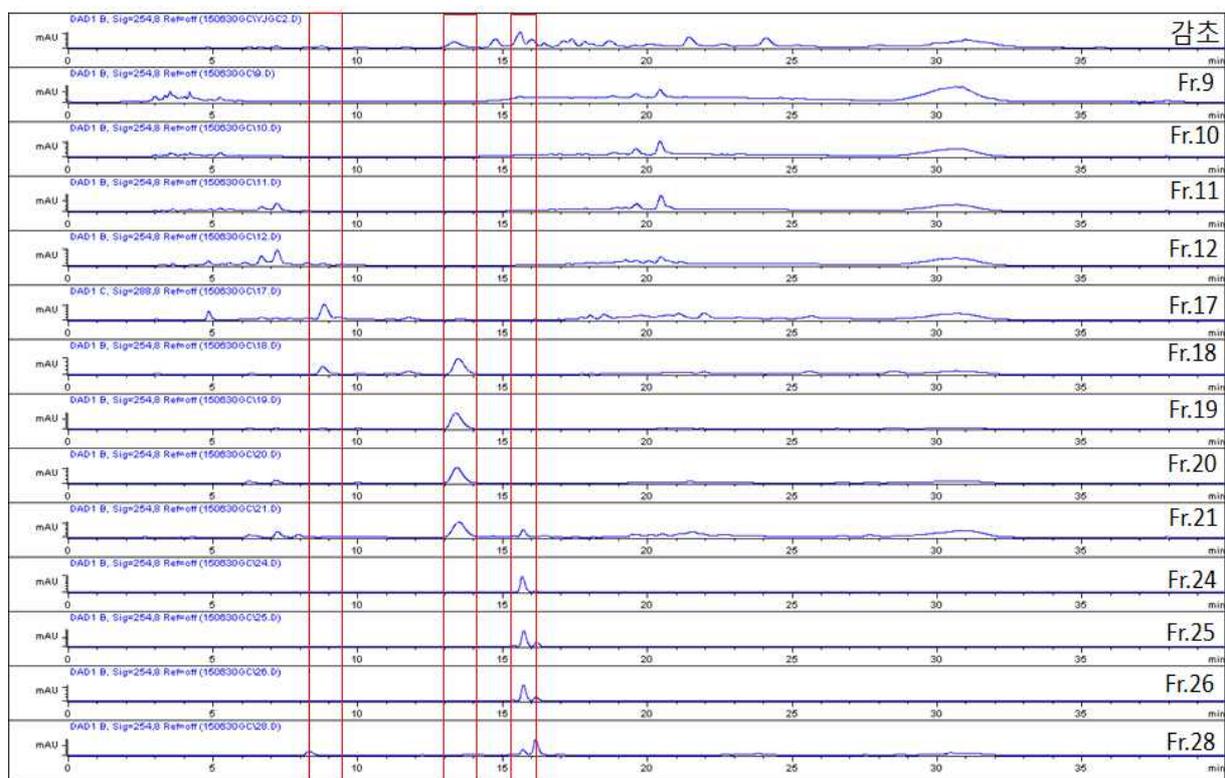
(3) HPLC 기기 분석 조건

조건	분석사항
분석 조건	<ul style="list-style-type: none"> • HPLC : Agilent 1200 HPLC system • Column : Agilent Phenomenex C18 4.6 * 150 mm (3.5um) • Temp : 30°C • Flow rate : 0.7 mL/min • Injection volume : 10 uL • Detector : Diode-Array detector (UV=254 nm) • Solvent : A : 0.1% Trifluoroacetic acid in water B : Acetonitrile

Time	% A 0.1% Trifluoroacetic acid in water	% B Acetonitrile
0	58	42
10	58	42
12	45	55
17	40	60
25	40	60
28	0	100
33	0	100
38	58	42
10	58	45



<그림> 감초 추출물 HSCCC 분리 크로마토그래피



<그림> HSCCC 분리 HPLC 크로마토그래피

- HSCCC 조건으로 3가지의 성분을 대량 분리 조건 확보하였고, 대량 분리가 가능해졌음.

(4) 구조 규명

^1H -, ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H COSY, DEPT, HBQC, HMBC spectroscopic data로부터 다음과 같이 구조를 규명함.

Sophoroisoflavone A (1) $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_6$ EI-MS: m/z 352 $[\text{M}]^+$ ^1H -NMR (600 MHz, DMSO): δ 1.30 (s, H-4", 5"), 5.63 (d, H-2", $J = 10.0$ Hz), 6.22 (H-6, $J = 1.8$ Hz), 6.39 (H-8, $J = 1.8$ Hz), 6.42 (H-3 ϕ , $J = 8.4$ Hz), 6.60 (d, H-1", $J = 10.0$ Hz), 6.92 (d, H-2 ϕ , $J = 8.4$ Hz), 8.12 (s, H-2), 9.76, 10.87 (br, 7, 4 ϕ -OH), 12.99 (s, 5-OH)

^{13}C -NMR (600 MHz, DMSO): δ 27.92 (C-4", 5"), 76.27 (C-3"), 94.14 (C-8), 99.37 (C-6), 104.83 (C-4a), 107.75 (C-3 ϕ), 109.44 (C-5 ϕ), 110.04 (C-1 ϕ), 117.26 (C-1"), 120.31 (C-3), 129.02 (C-2"), 131.70 (C-2 ϕ), 151.83 (C-6 ϕ), 153.88 (C-4 ϕ), 155.58 (C-2), 158.04 (C-8a), 162.38 (C-5), 164.65 (C-7), 180.57 (C-4)

Semilicoisoflavone B (2) $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{O}_6$ EI-MS: m/z 352 $[\text{M}]^+$ ^1H -NMR (600 MHz, DMSO): δ 1.39 (s, H-4", 5"), 5.76 (d, H-2", $J = 10.0$ Hz), 6.23 (H-6, $J = 1.5$ Hz), 6.37 (H-1", $J = 10$ Hz), 6.38 (H-8, $J = 1.5$ Hz), 6.73 (d, H-6 ϕ , $J = 1.0$ Hz), 6.91 (d, H-2 ϕ , $J = 1.0$ Hz), 8.34 (s, H-2), 12.95 (s, 5-OH) ^{13}C -NMR (600 MHz, DMSO): δ 27.942 (C-4", 5"), 76.47 (C-3"), 94.16 (C-8), 99.47 (C-6), 104.83 (C-4a), 117.47(C-2 ϕ), 118.01 (C-6 ϕ), 121.90 (C-5 ϕ), 122.47 (C-1"), 122.58 (C-1'), 123.20

(C-3), 131.73 (C-2^{''}), 140.53 (C-4^ϕ), 145.58 (C-3^ϕ), 154.70 (C-2), 158.01 (C-8a), 162.46 (C-5), 164.79 (C-7), 180.54 (C-4)

2,3-dehydrokievitone (3) C₂₀H₁₈O₆ EI-MS: *m/z* 354 [M]⁺ ¹H-NMR (600 MHz, DMSO): δ 1.63 (H-5^{''}), 1.75 (H-4^{''}), 3.32 (H-1^{''}), 5.16 (H-2^{''}), 6.26 (H-5^ϕ, *J* = 8.2, 2.0 Hz), 6.31 (s, H-6), 6.36 (H-3^ϕ, *J* = 2.0 Hz), 6.97 (H-6^ϕ, *J* = 8.2 Hz), 8.21 (s, H-2), 9.28, 9.37, 10.78 (br, 7, 2^ϕ, 4^ϕ-OH), 12.93 (5-OH)

¹³C-NMR (600 MHz, DMSO): δ 18.16 (C-4^{''}), 21.48 (C-1^{''}), 25.91 (C-5^{''}), 98.79 (C-6), 103.06 (C-3^{''}), 104.93 (C-4a), 106.26 (C-8), 106.66 (C-5^{''}), 109.15 (C-1^{''}), 120.60 (C-3), 122.66 (C-2^{''}), 131.49 (C-3^{''}), 132.66 (C-6^{''}), 155.32 (C-8a), 155.83 (C-2), 156.88 (C-2^{''}), 159.00 (C-4^{''}), 159.88 (C-5), 161.88 (C-7), 181.24 (C-4)

Parvisoflavone A (4) C₂₀H₁₆O₆ EI-MS: *m/z* 352 [M]⁺ ¹H-NMR (600 MHz, DMSO): δ 1.43 (s, 6H, H-4^{''}, 5^{''}), 5.76 (d, H-2^{''}, *J* = 10 Hz), 6.25 (H-6), 6.28 (H-5['], *J* = 8.2, 2.0 Hz), 6.38 (d, H-3['], *J* = 2.0 Hz), 6.66 (H-1^{''}, *J* = 10 Hz), 6.99 (H-6['], *J* = 8.2 Hz) 8.25 (s, H-2), 9.32 (2^ϕ-OH), 9.41 (4^ϕ-OH), 12.93 (5-OH)

¹³C-NMR (600 MHz, DMSO): δ 27.63 (C-4^{''}, 5^{''}), 78.09 (C-3^{''}), 99.26 (C-6), 100.72 (C-8), 102.58 (C-3[']), 105.35 (C-4a), 106.21 (C-5[']), 108.24 (C-1[']), 113.90 (C-1^{''}), 120.64 (C-3), 128.07 (C-2^{''}), 132.15 (C-6[']), 151.60 (C-8a), 155.46 (C-2), 156.38 (C-2[']), 158.57 (C-7), 158.64 (C-4[']), 161.28 (C-5), 180.72 (C-4)

7-O-methyluteon (5) C₂₁H₂₀O₆ EI-MS: *m/z* 368 [M]⁺ ¹H-NMR (600MHz, DMSO-d₆) δ :1.62(3H, s, H-5^{''}), 1.73(3H, s, H-4^{''}),3.26(2H, d,*J* = 6.87 Hz, H-1^{''}), 3.90 (3H, s, 7-OCH₃), 5.14(1H, t-like, H-2^{''}), 6.30(1H, dd,*J* = 8.24, 2.3, H-5[']), 6.40 (1H, s, *J* = 2.3, H-3[']), 6.69 (1H, s, H-8), 7.00 (1H, d, *J* = 8.22, H-6[']), 8.24 (1H, s, H-2), 9.33 (1H, s, 2[']-OH), 9.41 (1H, s, 4[']-OH), 13.17 (1H, s, 5-OH) ¹³C-NMR (150MHz, DMSO-d₆) δ :18.06(C-4^{''}), 21.44(C-1^{''}), 25.90(C-5^{''}), 56.75(7-OCH₃), 90.51(C-8), 103.15(C-3[']), 105.77(C-4a), 106.72(C-5[']), 109.09(C-1[']), 112.04(C-6), 121.17(C-3), 122.40(C-2^{''}), 131.40(C-3^{''}), 132.62(C-6[']), 155.89(C-2), 156.36(C-8a), 156.86(C-2[']), 158.18(C-5), 159.09(C-4[']), 163.19(C-7), 181.08(C-4)

Dehydroglyasperin C (6) C₂₁H₂₂O₅; EI-MS: *m/z* 354 [M]⁺ ¹H-NMR, (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 1.62 (3 H, s, H-5^{''}), 1.70 (3 H, s, H-4^{''}), 3.14 (2 H, d, *J*=6.54, H-1^{''}), 3.67 (3 H, s, OCH₃-5), 4.83 (2 H, s, CH₂-2), 5.13 (1 H, t-like, H-2^{''}), 6.14 (1 H, s, H-8), 6.25 (1 H, dd, *J*=8.3, 2.4, H-5[']), 6.32 (1 H, s, *J*=2.4, H-3[']), 6.64 (1 H, s, H-4), 7.04 (1 H, d, *J*=8.3, H-6[']), 9.39 (1 H, s, OH-4), 9.54 (1 H, s, OH-7), 9.60 (1 H, s, OH-2[']);

¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 18.12 (C-4^{''}), 22.61 (C-1^{''}), 25.94 (C-5^{''}), 62.10 (C-5, OCH₃), 67.73 (C-2, CH₂), 98.89 (C-8), 103.18 (C-3[']), 107.30 (C-5[']), 109.21 (C-4a), 114.36 (C-6), 115.06 (C-4), 117.02 (C-1[']), 124.37 (C-2^{''}), 127.97 (C-3), 129.12 (C-6[']), 129.95 (C-3^{''}), 152.74 (C-8a), 155.38 (C-5), 156.24 (C-7), 156.57 (C-2[']), 158.46 (C-4[']).

Dehydroglyasperin D (7) $C_{22}H_{24}O_5$; EI-MS: m/z 368 $[M]^+$ 1H -NMR, (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.68 (3 H, s, H-5 $''$), 1.76 (3 H, s, H-4 $''$), 3.23 (2 H, d, $J=6.85$, H-1 $''$), 3.73 (3 H, s, OCH $_3$ -5), 3.80 (3 H, s, OCH $_3$ -7), 4.95 (1 H, s, CH $_2$ -2), 5.14 (1 H, t-like, H-2 $''$), 6.31 (1 H, dd, $J=8.37$, 2.4, H-5 $'$), 6.38 (1 H, s, H-8), 6.40 (1 H, s, $J=2.4$, H-3 $'$), 6.74 (1 H, s, H-4), 7.12 (1 H, d, $J=8.37$, H-6 $'$), 9.47 (1 H, s, OH-4 $'$), 9.69 (1 H, s, OH-2 $'$);

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 18.08 (C-4 $''$), 22.53 (C-1 $''$), 25.94 (C-5 $''$), 56.19 (C-7, OCH $_3$), 62.22 (C-5, OCH $_3$), 67.80 (C-2, CH $_2$), 95.75 (C-8), 103.25 (C-3 $'$), 107.36 (C-5 $'$), 114.67 (C-4), 115.53 (C-6), 116.71 (C-1 $'$), 124.00 (C-2 $''$), 128.71 (C-3), 129.20 (C-6 $'$), 130.40 (C-3 $''$), 153.16 (C-8a), 154.88 (C-5), 156.53 (C-2 $'$), 157.99 (C-7), 158.45 (C-4 $'$)

Isoangustone A (8) $C_{25}H_{26}O_6$; EI-MS: m/z 422 $[M]^+$ 1H -NMR, (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.62 (3 H, s, H-5 $''$), 1.69 (6 H, s, H-4 $''$, 5 $''$), 1.72 (3 H, s, H-4 $''$), 3.23 (4 H, s, CH $_2$, 1 $''$ and 1 $''$), 5.17 (1 H, t, H-2 $''$), 5.28 (1 H, t, H-2 $''$), 6.44 (1 H, s, H-8), 6.66 (1 H, d, $J=1.2$, H-6 $'$), 6.88 (1 H, s, $J=1.2$, H-2 $'$), 8.26 (1 H, s, H-2), 8.36, 9.36, 10.86 (each, 1 H, H, OH-3 $'$, 4 $'$, 7), 13.28 (OH-5);

^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 18.16 (C-4 $''$, 4 $''$), 21.50 (C-1 $''$), 25.95 (C-5 $''$), 26.01 (C-5 $''$), 28.75 (C-1 $''$), 93.31 (C-8), 104.72 (C-4a), 111.42 (C-6), 114.46 (C-2 $'$), 120.91 (C-6 $'$), 122.55 (C-3), 122.63 (C-2 $''$), 122.99 (C-1 $'$), 123.50 (C-2 $''$), 128.41 (C-5 $'$), 131.15 (C-3 $''$), 131.37 (C-3 $''$), 143.58 (C-4 $'$), 144.94 (C-3 $'$), 154.11 (C-2), 155.75 (C-8a), 159.27 (C-5), 162.38 (C-7), 180.77 (C-4).

Liquiritigenin (9) $C_{15}H_{12}O_4$ EI-MS: m/z 256 $[M]^+$ 1H -NMR (600MHz, DMSO- d_6): δ 2.68 (dd, $J = 2.4, 16.6$ Hz, H-3 eq), 3.05 (dd, $J = 16.6, 13.0$ Hz, H-3 ax), 5.37 (dd, $J = 13.0, 2.4$ Hz, H-2), 6.35 (d, $J = 1.49$ Hz, H-8), 6.50 (dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, H-6), 6.81 (d, $J = 8.4$ Hz, H-3 $'$, 5 $'$), 7.32 (d, $J = 8.4$, H-2 $'$, 6 $'$), 7.72 (d, $J = 8.4$ Hz, H-5)

^{13}C -NMR (150MHz, DMSO- d_6): δ 43.55 (C-3), 79.64(C-2), 102.42(C-8), 110.35 (C-6), 113.60 (C-4a), 114.92 (C-3 $'$, 5 $'$), 127.60 (C-2 $'$, 6 $'$), 128.45 (C-5), 129.96 (C-1 $'$), 157.58 (C-4 $'$), 164.17 (C-8a), 165.37 (C-7), 192.14 (C-4)

Isoliquiritigenin (10) $C_{15}H_{12}O_4$ EI-MS: m/z 256 $[M]^+$ 1H -NMR (600MHz, DMSO- d_6): δ 6.28(1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-3), 6.41 (1H, dd, $J = 8.90, 2.0$ Hz, H-5), 6.84 (2H, d, $J = 8.40$ Hz, H-3 $'$, H-5 $'$), 7.75 (2H, s, H-a, H-b), 7.76 (d, $J = 8.60$, H-2 $'$, H-6 $'$), 8.17 (1H, $J = 8.90$, H-6), 13.62 (s, H-4-OH)

^{13}C -NMR (150MHz, DMSO- d_6): δ 102.52 (C-3), 108.04 (C-5), 112.96(C-1), 115.77 (C-3 $'$, 5 $'$), 117.44 (C-a), 125.74 (C-1 $'$), 131.20 (C-2 $'$, 6 $'$), 132.84 (C-6), 144.23 (C-b), 160.02 (C-4 $'$), 164.89 (C-4), 165.75 (C-2), 191.49 (C=O)

liquiritin (11) $C_{21}H_{22}O_9$ 1H -NMR (250 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.66 (1H, dd, $J=2.7, 16.7$ Hz, H-3), 3.07-3.40 (5H, m, 2 $''$, 3 $''$, 4 $''$, 5 $''$ and H-3), 3.46 ((1H, dd, $J=5.4, 11.2$ Hz) and 3.68 (1H, dd, $J=3.8, 11.5$ Hz, H-6 $''$)), 4.88 (1H, d, $J=7.1$ Hz, H-1 $''$), 5.52 (1H, dd, $J=2.5, 12.6$ Hz, H-2), 6.34 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 6.50 (1H, dd, $J=2.1, 8.7$ Hz, H-6), 7.06 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-3 $'$, 5 $'$), 7.44 (2H, d, $J=8.7$ Hz, H-2 $'$, 6 $'$), 7.64 (1H, d, $J=8.7$ Hz, H-5).

^{13}C -NMR (62.5 MHz, DMSO- d_6) δ : 78.9 (C-2), 43.4 (C-3), 190.2 (C-4), 132.6 (C-5), 110.8 (C-6), 164.9 (C-7), 102.8(C-8), 163.3 (C-9), 113.8 (C-10), 132.6 (C-1 $'$), 128.2 (C-2 $'$), 116.4 (C-3 $'$), 157.7(C-4 $'$), 116.4 (C-5 $'$), 128.2 (C-6 $'$), 100.5 (C-1 $''$), 73.4 (C-2 $''$), 76.8 (C-3 $''$) 69.9(C-4 $''$), 77.3 (C-5 $''$), 60.9 (C-6 $''$).

□ 코코넛오일과 국산감초 추출물 확보 및 최적 효력비율 확보

- 1차년도 연구방향으로는 코코넛오일을 용매로 하여 추출하는 방법으로 논의하였으나, 대량 공정과정 논의 결과 코코넛오일을 용매로 사용하면

- ① 가열 추출 시에 오일의 특성상(MCT) 가수분해가 잘되고 산패가 빠르게 진행되고,
- ② 추출 후에 나오는 감초 찌꺼기가 코코넛오일에 남아있어 필터하는 공정 추가와 폐기물 처리비용이 추가적으로 발생하고,
- ③ 가열 된 유지를 이용한 추출공정은 지표물질의 관리에 어려움이 있다는 결과가 나옴.

- 2차년도 연구방향은 코코넛오일에 추출된 국산감초추출물을 넣어 소프트 캡슐의 건기식 제조로 하기로 논의함.

(1) 영주 감초의 년생별 glycyrrhizin 함량 측정

영주 감초 1, 2, 3, 4년생을 50%, 80% 주정으로 실온 24h 추출하여 glycyrrhizin 함량을 측정함.

① HPLC 기기 분석 조건

조건	분석사항
분석 조건	<ul style="list-style-type: none"> • HPLC : Agilent 1200 HPLC • Column : Agilent ZorbaxSB-C18 (11A 3.5ul, 4.6 x 150mm) • Temp : 30℃ • Flow rate : 0.7 • Injection volume : 10ul • Detector : 254 • Solvent : A : D.W(add 0.1% Trifluoroacetic acid) <li style="padding-left: 20px;">B : acetonitrile

Time	% A	% B
0	70	30
40	0	100
45	0	100
50	70	30
60	70	30

② HPLC 패턴 분석 및 glycyrrhizin 함량 측정

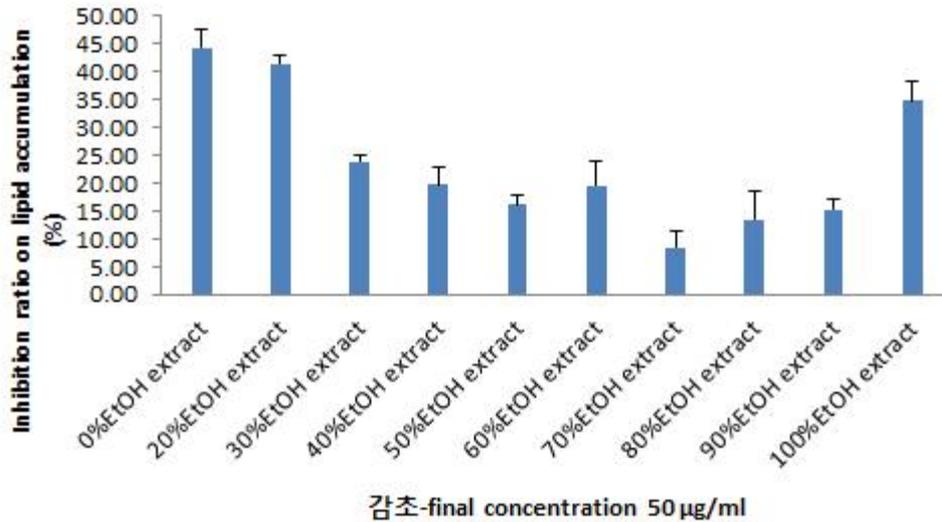
- glycyrrhizin 함량 결과

감초 년생	Glycyrrhizin / 감초추출물(mg/g)		
	주정 0%	주정 50%	주정 80%
1	109.80	113.19	79.06
2	150.12	182.45	205.06
3	312.16	321.59	193.18
4	301.09	160.12	111.14

- 감초 년생이 증가 할수록 Glycyrrhizin 함량이 증가하였고, 년생 수가 증가 할수록 재배 기간도 길고, 가격도 비싸지기 때문에(37,000~45,000원/kg) 1~2년생 감초로 선정하였고, 감초 구입은 경북 영주 한림농원에 1kg에 20,000원 구입이 가능함.

(2) 3T3-L1을 이용한 항비만 효능평가

3T3-L1 세포를 24well plate에 배양하여 분화촉진 물질인 insulin, dexamethasone, IBMX (Differentiation Medium)와 추출물(0~100% 추출물)을 처리하여 Oil Red O 시약에 염색시켜 상대적인 TG의 OD값을 측정함. 염색된 세포의 지질 방울은 이소프로판올에 용해시키고 마이크로플레이트 리더기를 사용하여 540 nm에서 O.D값(흡광도)을 측정함.



<그림> 감초 주정 비율에 따른 지질 축적 억제능 평가

- 감초 주정 비율을 달리하여 3T3-L1을 이용한 지질 축적 억제능 평가 결과 0, 20, 100%에서 지질 축적 억제를 보임. 100% 주정은 대량 추출 공정에서 단가가 많이 비싸고, 주정 추출 시 위험하여 방폭 장치가 있어야 하기 때문에 방폭 장치가 있는 건기식 GMP인증 업체가 거의 없으며 설치 시 비용도 많이 발생하는 단점이 있음.
- 일차적인 실험 결과로 감초의 물추출물과 에탄올비율별 추출물을 비교 확인한 결과 산업화가 가능한 수준의 추출형태와 효능결과를 종합해 볼 때에 물추출물을 포함하여야 하는 것으로 방향성 향기성분이 기여할 수 있는 부분은 크게 없는 것으로 이미 고려된 상태임.
- 이에 지질 축적 억제능이 우수한 감초 물추출물로 선정하고, 시료는 한국 경북 영주 한림농원에서 재배하는 1-2년생으로 선정함.

□ 기준규격 설정

- 코코넛오일을 용매로 사용하는 추출제조하는 공정의 어려움으로 2차년도 연구방향은 코코넛 오일에 추출된 국산감초추출물을 넣어 소프트 캡슐의 건기식 제조로 하기로 함.
- 지질 축적 억제능 실험 결과 감초 물추출물이 우수하여 기존에 비극성물질로 지표성분을 진행하려고 한 내용을 수정하여, 감초의 지표성분으로는 현재 많이 사용하고 있는 글리시리진(glycyrrhizin), 리퀴리틴(liquiritin)으로 선정함.

(1) 글리시리진(glycyrrhizin)

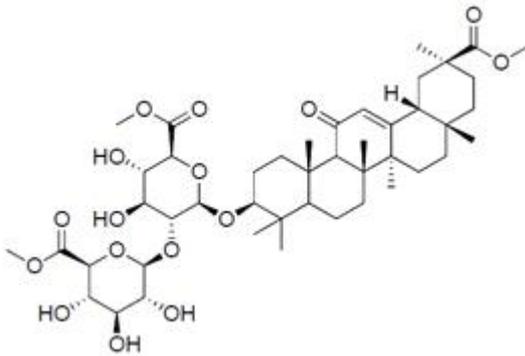
성상 : prismatic crystal

이명

CAS number 137476-70-1

분자식 $C_{42}H_{62}O_{16}$ (MW 822.93)

구조



(2) 고속액체 크로마토그래프법

감초의 주성분인 글리시리진(glycyrrhizin)을 고속액체 크로마토그래프법(high performance liquid chromatography)으로 정량함.

- 1) 시료 약 0.2g을 정확히 달아 둥근 후라스크에 넣고 물 30ml를 가하여 3시간 환류추출함.
- 2) 추출액을 원심분리하여 상정액을 100ml의 용량 플라스크에 옮기고, 둥근 플라스크 및 원심분리관을 에탄올 20ml씩으로 3회 세척하여 여과하고 100ml의 용량플라스크에 옮겨 정용함.
- 3) 이 용액 10 μ l를 고속액체 크로마토그래프에 주입함.
- 4) 검량선 작성
 - ① 글리시리진 표준품 약 20mg을 정확히 달아 메탄올을 녹이고 50ml로 정용하여 보관용액으로 함.
 - ② 보관용액 1, 2, 3, 4, 5ml를 정확히 취하고 메탄올 용액을 가하여 최종부피가 각각 5ml가 되도록 표준용액을 조제한 다음 이 용액 10 μ l를 고속액체 크로마토그래프에 주입하여 글리시리진을 분석함.
- 5) 고속액체 크로마토그래프 분석
 - 관(column) : μ -Bondapak C18(3.9mm I.D. \times 300mm)
 - 이동상 : 메탄올 - 0.05M 이수소 인산소다 수용액(58 : 42, v/v)
 - 검출기 : 자외선 검출기(파장 254nm)

- 재현성

Repeatability of peak area ratio and retention time for standard by HPLC
(n=5)

Compounds	Peak area ratio (peak area/IS area)		Retention time (min)	
	Mean	RSD (%)	Mean	RSD (%)
Glycyrrhizin	0.14	0.31	19.74	0.07

- 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계

Calibration graphs, linear ranges, LOD and LOQ

Analytes	Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	Correlation coefficient	Slope	Intercept	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Glycyrrhizin	0.5-200	0.9995	0.0393	-0.0274	120.0	400

- 정확성 · 정밀성

Precision and accuracy of analytical results (n=3)

Compounds	Fortified conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Intra-day (n=3)			Inter-day (n=3)		
		Observed conc.	Precision	Accuracy	Observed Conc.	Precision	Accuracy
Glycyrrhizin	20	20.19			19.87		
	55.2	55.53			56.44		
	116	115.91			115.44		

- 완건성

Robustness of Glycyrrhizin (n=3)

Compounds	Analytical condition	Theoretical plate (N)	Resolution	Selectivity
Glycyrrhizin	Column	inertil ^R ODS-3	54999	3.42
		luna C18	75588	5.38
		sunfire TM C18	77903	6.65
	Column temp.	25 $^{\circ}\text{C}$	59498	2.88
		30 $^{\circ}\text{C}$	77616	4.84
		35 $^{\circ}\text{C}$	77012	5.74
		40 $^{\circ}\text{C}$	77705	6.60

All columns are those of analytical, 4.6 x 250 mm, 5 μm ; Inertsil[®] ODS-3 (GL Science Inc.); Luna C18 (Phenomenex); SunFireTM C18 (Waters)

Pore size (\AA): Inertsil[®] ODS-3 (100); Luna C18 (100); SunFireTM C18 (90)
Surface area (m^2/g): Inertsil[®] ODS-3 (450); Luna C18 (400); SunFireTM C18 (349)

(3) 리퀴리틴(liquiritin)

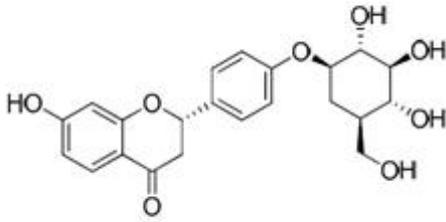
성상 : needle crystal

이명

CAS number 551-15-5

분자식 $C_{21}H_{22}O_9$ (MW 418.39)

구조



(4) 고속액체 크로마토그래프법

감초의 주성분인 리퀴리틴(liquiritin)을 고속액체 크로마토그래프법(high performance liquid chromatography)으로 정량함.

- 1) 시료 약 0.2g을 정확히 달아 둥근 후라스크에 넣고 물 30ml를 가하여 3시간 환류추출함.
- 2) 추출액을 원심분리하여 상정액을 100ml의 용량 플라스크에 옮기고, 둥근 플라스크 및 원심분리관을 에탄올 20ml씩으로 3회 세척하여 여과하고 100ml의 용량플라스크에 옮겨 정용함.
- 3) 이 용액 10 μ l를 고속액체 크로마토그래프에 주입함.
- 4) 검량선 작성
 - ① 리퀴리틴(liquiritin) 표준품 약 20mg을 정확히 달아 메탄올을 녹이고 50ml로 정용하여 보관용액으로 함.
 - ② 보관용액 1, 2, 3, 4, 5ml를 정확히 취하고 메탄올 용액을 가하여 최종부피가 각각 5ml가 되도록 표준용액을 조제한 다음 이 용액 10 μ l를 고속액체 크로마토그래프에 주입하여 리퀴리틴(liquiritin)을 분석함.

(5) 고속액체 크로마토그래프 분석

- o 관(column) : μ -Bondapak C18(3.9mm I.D. \times 300mm)
- o 이동상 : 메탄올 - 0.05M 이수소 인산소다 수용액(58 : 42, v/v)
- o 검출기 : 자외선 검출기(파장 254nm)

- 범위, 직선성, 검출한계 및 정량한계

Calibration graphs, linear ranges, LOD and LOQ

Analytes	Linear range (µg/mL)	Correlation coefficient	Slope	Intercept	LOD (ng/mL)	LOQ (ng/mL)
Liquiritin	1.0-100	0.9991	0.0235	-0.0409	130.4	434.8

- 재현성

Repeatability of peak area ratio and retention time for standard by HPLC (n=5)

Compounds	Peak area ratio (peak area/IS area)		Retention time (min)	
	Mean	RSD (%)	Mean	RSD (%)
Liquiritin	0.09	0.76	12.83	0.09

- 정확성 · 정밀성

Precision and accuracy of analytical results (n=3)

Compounds	Fortified conc. (µg/mL)	Intra-day (n=3)			Inter-day (n=3)		
		Observed conc.	Precision	Accuracy	Observed Conc.	Precision	Accuracy
Liquiritin	22.0	22.08			21.46		
	42.80	42.74			42.62		
	98.0	97.94			98.16		

- 완건성

Robustness of Glycyrrhizin (n=3)

Compounds	Analytical condition	Theoretical plate (N)	Resolution	Selectivity
Glycyrrhizin	Column	inertsil [®] ODS-3	28423	6.67
		luna C18	19638	6.74
		sunfire [™] C18	18861	6.86
	Column temp.	25 °C	27976	6.44
		30 °C	26200	6.86
		35 °C	19788	6.58
		40 °C	18952	6.82

All columns are those of analytical, 4.6 x 250 mm, 5 µm; Inertsil[®] ODS-3 (GL Science Inc.); Luna C18 (Phenomenex); SunFire[™] C18 (Waters)

Pore size (Å): Inertsil[®] ODS-3 (100); Luna C18 (100); SunFire[™] C18 (90)
Surface area (m²/g): Inertsil[®] ODS-3 (450); Luna C18 (400); SunFire[™] C18 (349)

(6) 코코넛 오일에 함유된 감초 물추출물(제품용 원료 복합물)의 글리시리진과 리퀴리틴 함량 분석 예비 시험

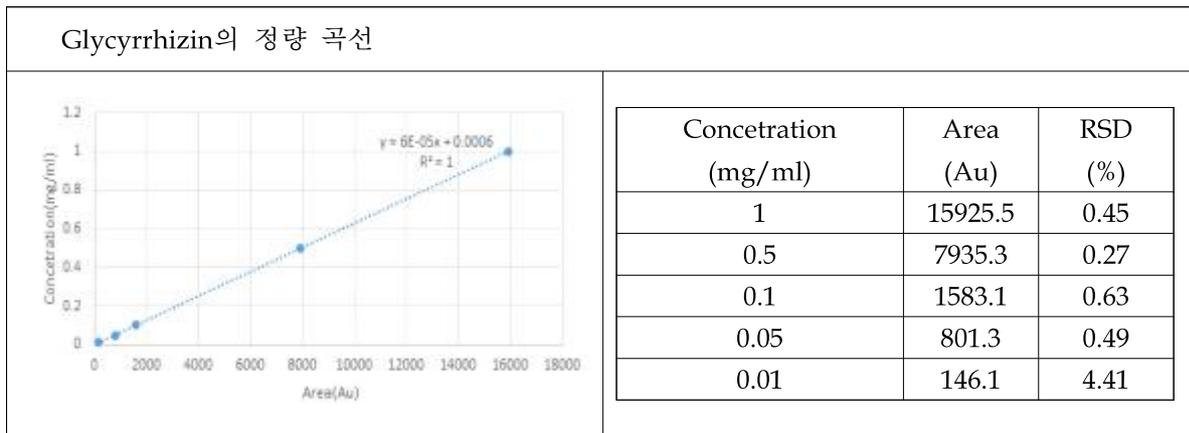
HPLC 기기 분석 조건

조건	분석사항
분석 조건	<ul style="list-style-type: none"> • HPLC : Agilent 1200 HPLC • Column : Agilent ZorbaxSB-C18 (11A 3.5ul, 4.6 x 150mm) • Temp : 30℃ • Flow rate : 0.7 • Injection volume : 10ul • Detector : 254 • Solvent : A : D.W(add 0.1% Trifluoroacetic acid) B : acetonitrile

Time	% A	% B
0	70	30
40	0	100
45	0	100
50	70	30
60	70	30

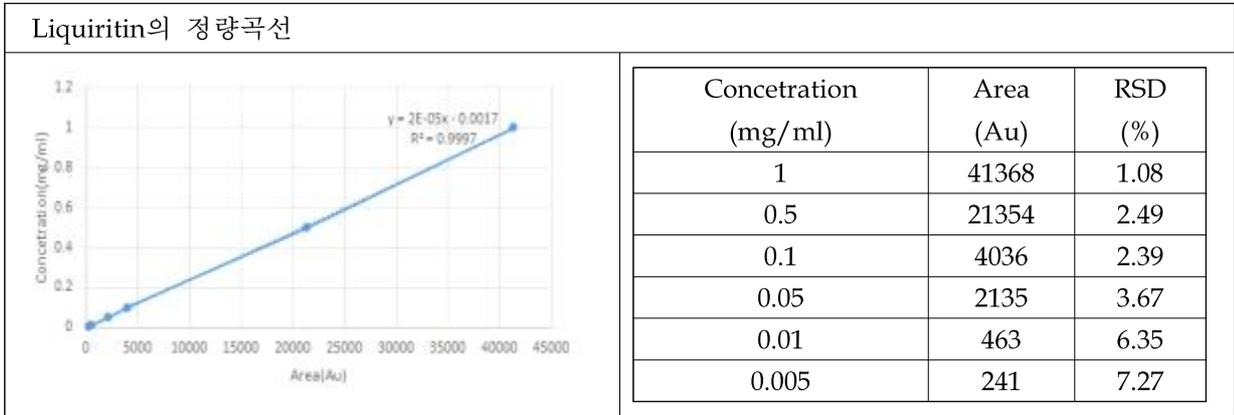
1) 글리시리진(glycyrrhizin)

글리시리진의 함량을 확인하기 위해 글리시리진을 10 mg/mL 의 농도로 methanol에 녹임. 녹은 시료를 희석시켜 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01 mg/mL의 농도로 제조하여 HPLC로 분석 후 calibration curve를 만들어 함량 분석에 활용함.



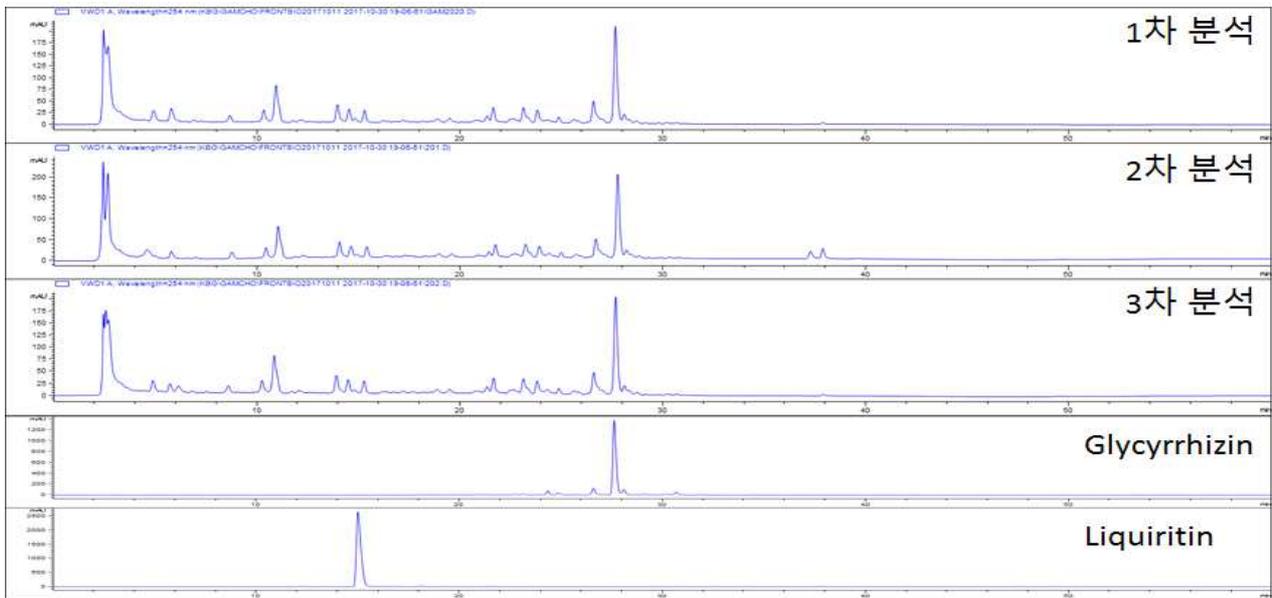
2) 리퀴리틴(liquiritin)

리퀴리틴의 함량을 확인하기 위해 리퀴리틴을 10 mg/mL 의 농도로 methanol에 녹임. 녹은 시료를 희석시켜 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 mg/mL 의 농도로 제조하여 HPLC로 분석 후 calibration curve를 만들어 함량 분석에 활용함.



3) 감초 물추출물의 Glycyrrhizin과 liquiritin 함량

감초 물추출물의 글리시리진과 리퀴리틴의 함량을 확인하기 위해 추출물을 10 mg/ml의 농도로 methanol에 녹여, 1 mg/mL로 희석 한 뒤 HPLC로 분석하여 calibration curve에 대입하여 함량을 구하였으며, 3반복 실험함.



<그림> 감초 물추출물의 HPLC chromatogram

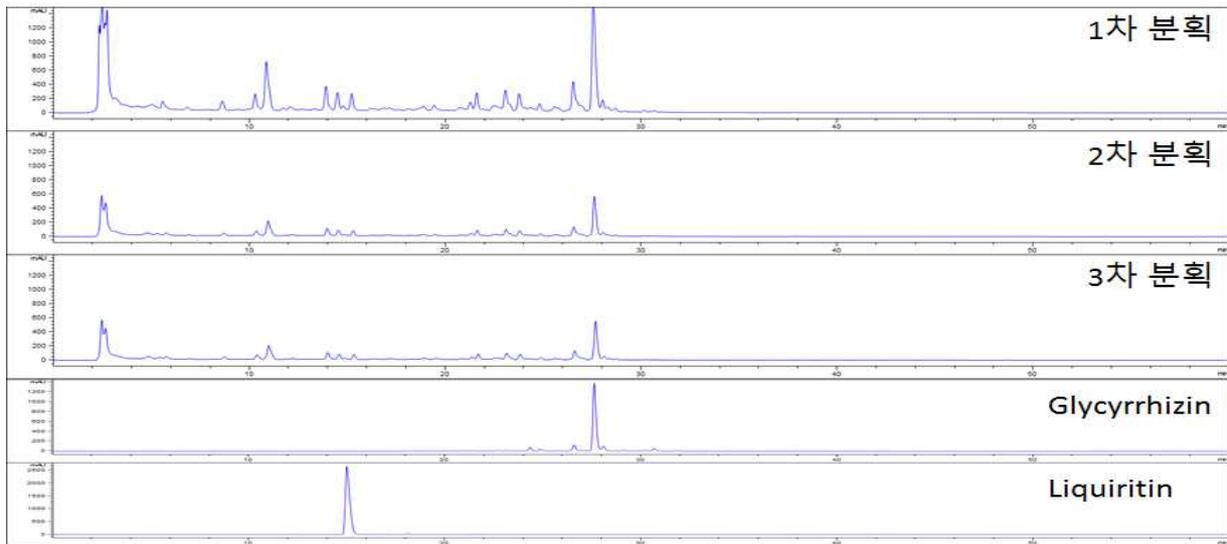
<표> 감초 물추출물의 Glycyrrhizin과 liquiritin 함량

감초 물추출물				
Compound	Glycyrrhizin(mg/g)	RSD%	Liquiritin(mg/g)	RSD%
1차 분석	152.72	1.21	6.36	0.05
2차 분석	150.07	0.55	6.39	0.58
3차 분석	149.91	0.68	6.31	0.73
평균	150.91	-	6.35	-

기준규격을 잡기 위한 예비 시험 결과 감초 물추출물에 함유된 liquiritin의 함량은 6.35 mg/g으로 glycyrrhizin의 함량은 150.91 mg/g으로 확인됨. 재시험이 필요할 것으로 사료됨.

4) 코코넛오일에 (감초 물추출물의 10% 함량)의 글리시리진과 리퀴리틴의 함량

10%의 농도로 코코넛 오일에 함유된 감초 물추출물의 글리시리진과 리퀴리틴 정량적 함량 분석 실험을 위해 hexane과 methanol을 1:1로 하여 총 2 mL의 용액을 만들고 감초 물추출물이 10%의 농도로 함유된 코코넛 오일 1 mL을 넣고, 5분간 sonication 후 10분간 방치시켜 하층액을 취한 후 HPLC로 분석함. 상층액은 methanol 용액과 1 : 1로 섞은 뒤 sonication 후 하층액을 HPLC로 분석하여 총 3회에 걸쳐 분획 실험함.



<그림> 코코넛오일에 (감초 물추출물의 10%함량)의 글리시리진과 리퀴리틴의 함량 분석을 위한 HPLC chromatogram

<표> 코코넛오일(감초 물추출물의 10%함량)의 글리시리진과 리퀴리틴의 함량

감초 물추출물(In Oil)		
Compound	Glycyrrhizin(mg/g)	Liquiritin(mg/g)
1차 분획 함량	1303.29	56.07
2차 분획 함량	405.45	18.09
3차 분획 함량	400.43	17.18
총량	2109.17	91.34

코코넛오일에 감초 물추출물의 10%의 글리시리진과 리퀴리틴의 함량은 liquiritin의 함량은 91.34 mg/g으로 glycyrrhizin의 함량은 2109.17 mg/g으로 확인됨. 코코넛 오일이 hexane층에 용해 될 때 글리시리진과 리퀴리틴도 헥산층으로 분배된 것으로 보이며, 또한 과량의 감초 물추출물을 소량의 methanol로 용해시키지 못하는 것도 함량 차이의 원인으로 보임.

두 원료의 지표성분이 대표성과 특이성을 가지고 있는 식약처 의견 필요로 식약처 모듬 토의 (날짜 기입 : 17년 12월 26일) 실시함. 토의 결과 지표성분의 대표성에 대한 의견 교환을 나누었으며, 특이성 및 대표성에 문제없음을 확인 받음.

□ 원료(코코넛오일, 감초추출물) 및 감초+코코넛오일을 혼합한 캡슐형 제품의 기준규격

(1) 시험 내용

1) 코코넛오일 유래 caprylic acid

FAMES(Fatty acid methyl esters)법을 사용하여 oil의 지표성분인 caprylic acid의 함량 및 비율을 확인하여 기준규격을 설정함.

2) 감초유래 Glycyrrhizin(글리시리진)과 liquiritin(리퀴리틴)

캡슐 제품 내 감초추출물의 지표물질(글리시리진과 리퀴리틴) 함량 확인을 통한 기준규격 설정함.

(2) 시험 방법

1) 캡슐 전처리

- ① 캡슐을 내용물과 분리하기 위해 증류수 2ml로 내용물을 씻어냄.
- ② 내용물에 2ml의 증류수를 넣고 다시 hexane 4ml을 넣어 주어 GUCO와 같은 방법으로 실험을 진행함.
- ③ 5분 sonication 후 상층에서 2ml을 취하여 농축기를 사용하여 농축함.
- ④ 농축된 시료를 FAMES 방법으로 유도체화하여 gas chromatography로 분석함.
- ⑤ 하층은 취하여 HPLC로 분석함.

2) 코코넛 오일

- ① FAMES(fatty acid methyl esters)를 사용
- ② 시료 20mg을 측정함.
- ③ 0.5 mol/L NaOH MeOH 2ml을 시료에 넣어 주고 heating block에서 20분 동안 100℃로 반응시킨 후 방냉시킴.
- ④ 3ml의 BF₃-MeOH(14%)를 넣어 주고 heating block에서 20분동안 100℃로 반응시키고 방냉시킴.
- ⑤ 2ml의 Hexane과 포화 NaCl 7ml를 넣어 주고 shaking 한 후 상층을 gas chromatography로 분석함.

3) 감초 물추출물

- ① 감초 물추출물의 지표물질은 리퀴리틴과 글리시리진으로 함.
- ② 글리시리진과 리퀴리틴을 50% MeOH로 하여 5개의 농도(1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005mg/ml)로 시료를 제작함. 이 때 I.S(internal standard)는 p-cumaric acid로 함.
- ③ 감초추출물 10mg을 1ml의 50% methanol (50% D.W v:v)에 용해시킴.
- ④ 용해시킨 감초추출물을 희석하여 1mg/ml의 분석시료로 함.
- ⑤ HPLC를 사용하여 분석함.

4) 실험 기기 및 조건

① Gas chromatography 분석

- o 실험시약 : BF₃-MeOH(14%) solution, hexane, NaCl, NaOH
- o 실험기기 : Gas chromatography(HP Agilent 6890N), Agilent HPLC 1200 series
- o 분석 조건

Column : HP5 5% phenyl methyl soloxane capillary 30.0m x 320um x 0.25um nominal

Injector Temp : 250°C, Detector Temp : 280°C

Split mode : Splitless, injection volumn : 1ul

Flow rate : 1ml/min

<표> Conditions of Gas chromatography

Run time (min)	°C/min	Hold time(min)	Next temp(°C)
5	-	5	50
47	5	0	260
51	5	0	280
60	5	5	300

② HPLC 분석 조건

o 분석 조건

Instrument : HPLC 1100 series, Column : Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 4.6×150 mm

Sample injection volume : 10 ul, Flow late : 0.7 ml/min

Temperature : room temperature

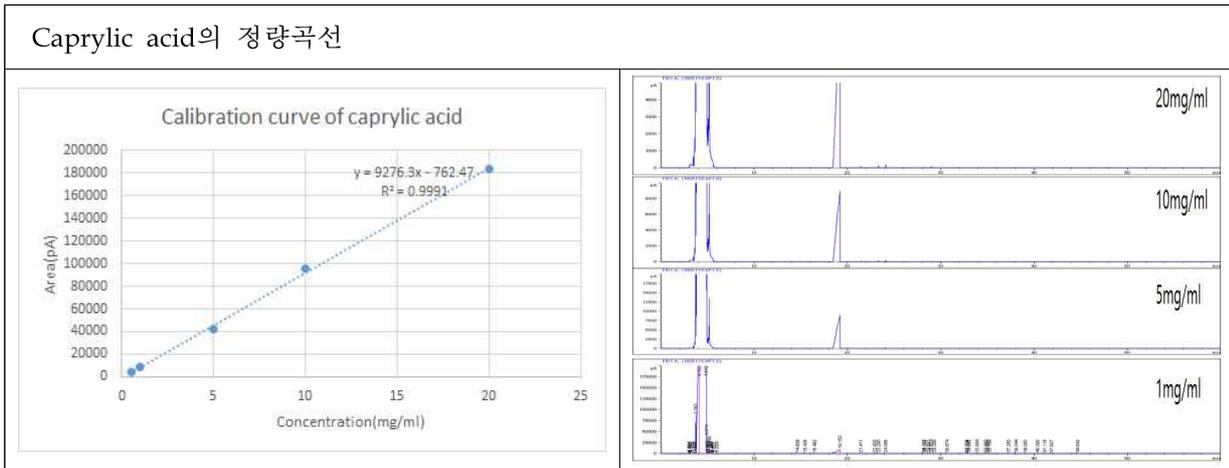
Wavelength : 254 nm

Mobile phase : water (add 0.1% TFA) and Acetonitrile, gradient elution

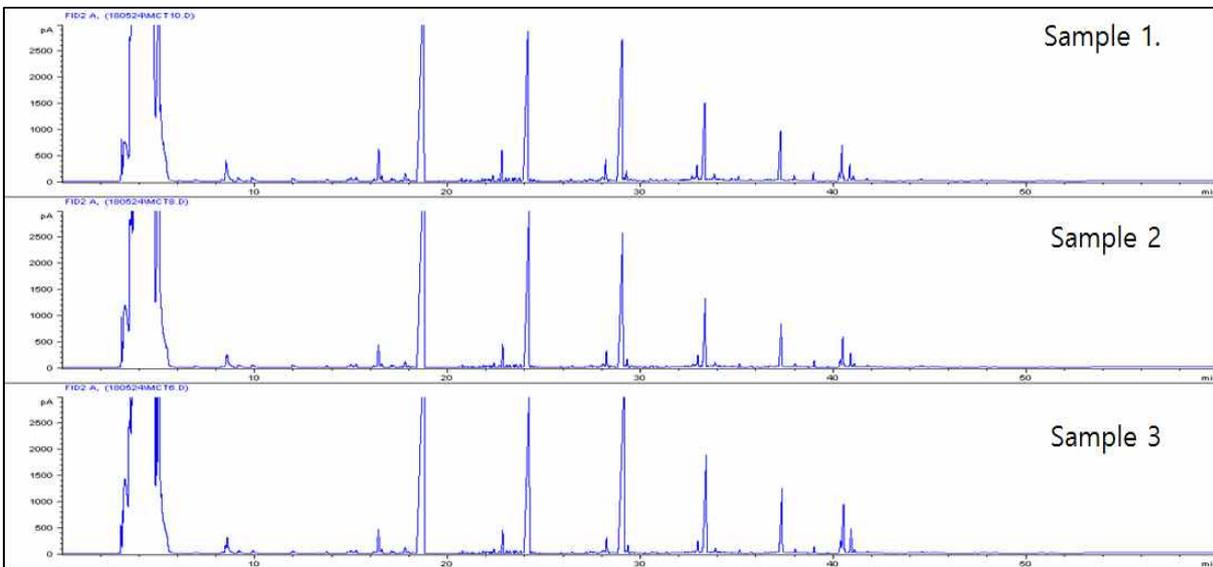
<표> The solvent gradient conditions of HPLC

time (min)	A : Water (0.1 TFA%)	B : Acetonitrile
0	30	70
20	60	40
30	0	100
35	30	70
40	30	70

(3) 코코넛오일 지표성분 - Caprylic acid



1) 코코넛오일(원료)에 함유하고 있는 Caprylic acid 함량



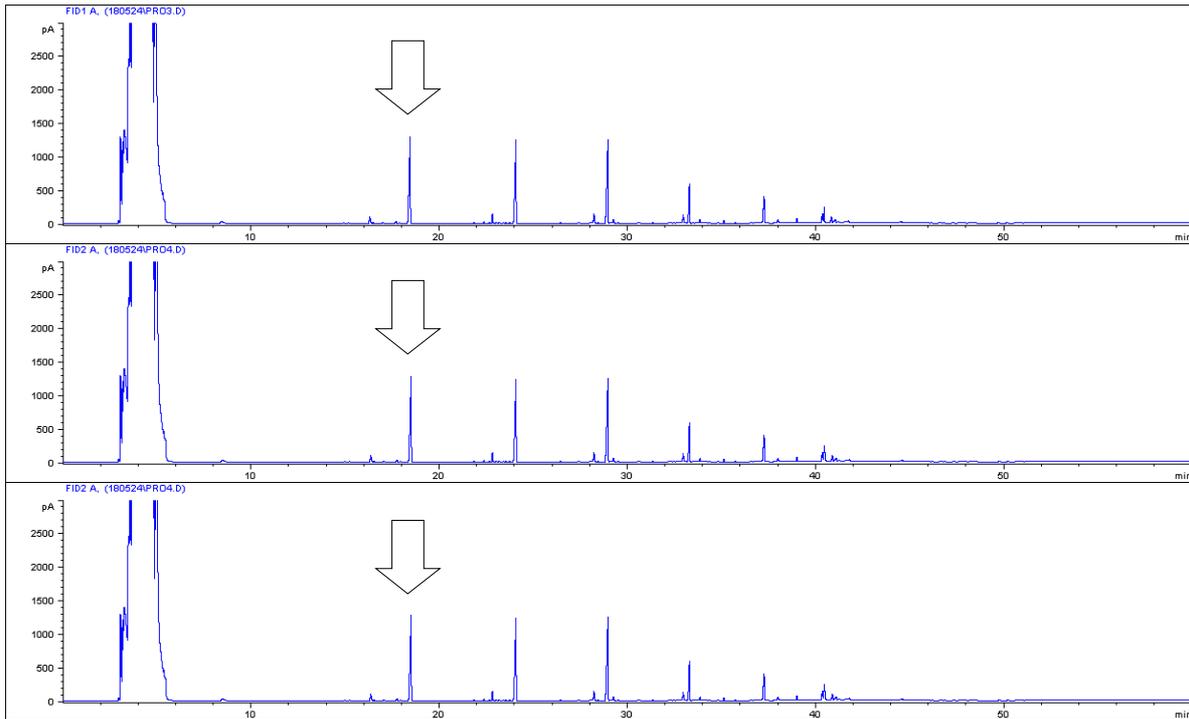
<그림> 코코넛오일 Caprylic acid의 Gas chromatograph

<표> 코코넛오일 안에 함유하고 있는 Caprylic acid 함량

No.	Retention time	Sample				
		Sample 1	Sample 2	Sample 3	평균	표준편차
1	18.76 (Caprylic acid)	388.13	395.72	385.04	389.63	5.52

2) 제품에 함유하고 있는 Caprylic acid 함량

〈그림〉 캡슐의 Caprylic acid의 Gas chromatograph

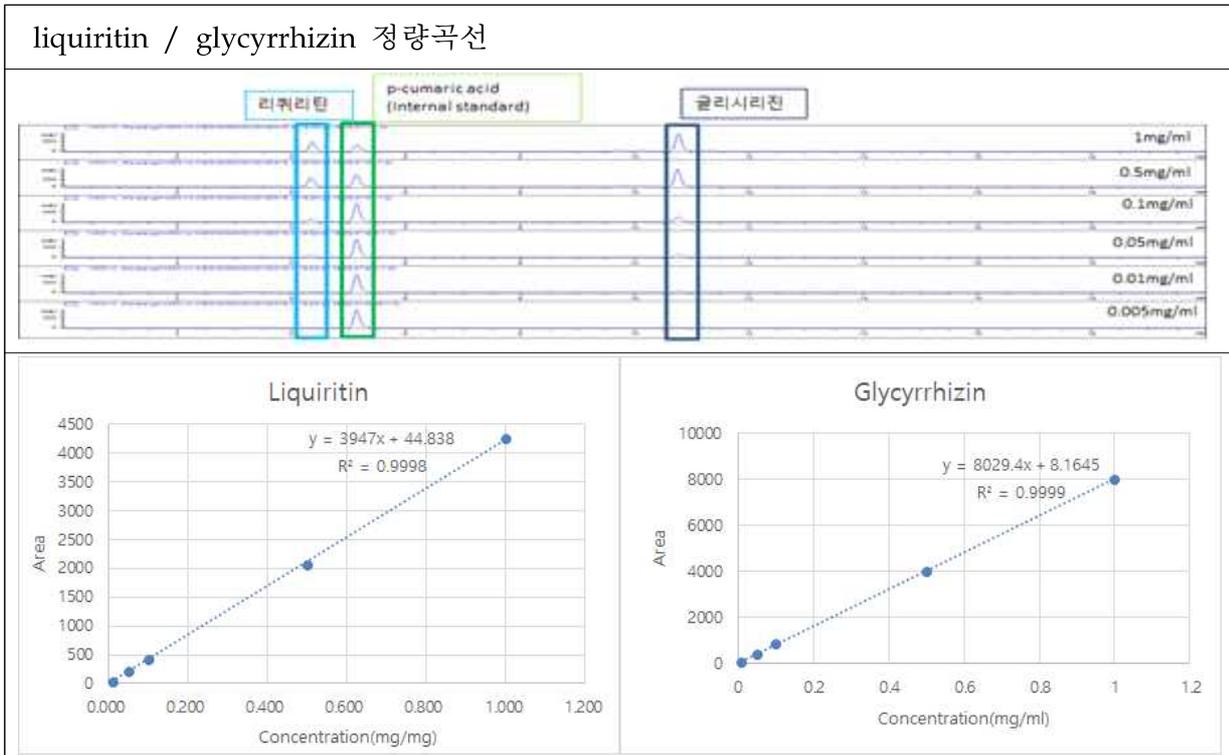


〈표〉 캡슐에 함유하고 있는 Caprylic acid 함량

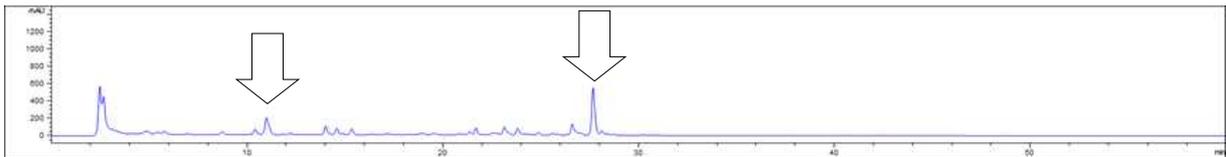
Sample		함량(mg/capsule)				
No.	Retention time	Sample 1	Sample 2	Sample 3	평균	표준편차
1	18.77 (Caprylic acid)	155.22	160.53	161.59	159.15	3.36

코코넛 오일에 함유된 caprylic acid는 389.63 mg/g으로 확인됨. 생산된 제품(캡슐)에 함유된 caprylic acid는 159.15 mg으로 확인됨.

(4) 감초 지표성분 - Liquiritin/ glycyrrhizin



1) 감초추출물 안에 함유하고 있는 Liquiritin/ glycyrrhizin

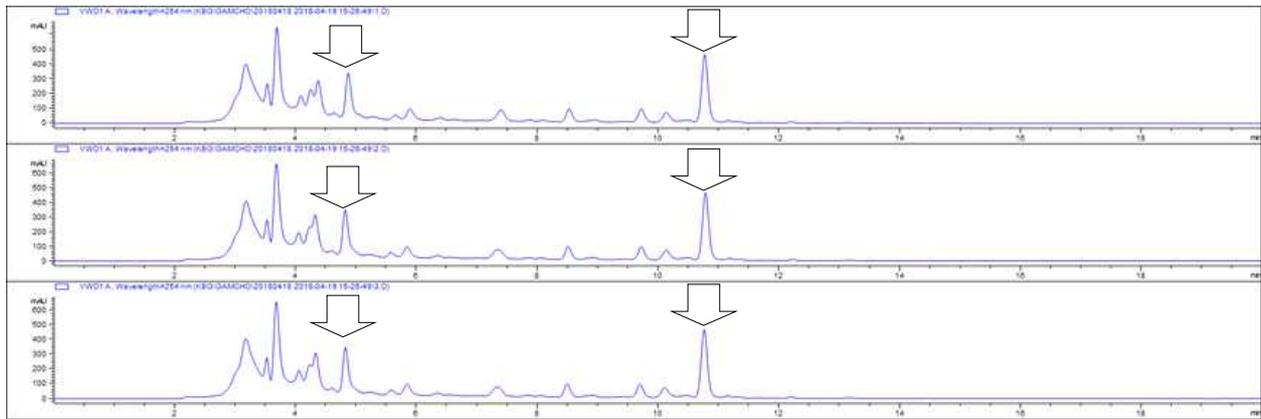


<그림> 감초추출물 안에 함유하고 있는 Liquiritin/ glycyrrhizin의 HPLC chromatograph

<표> 감초추출물(원료)에 함유하고 있는 Liquiritin/ glycyrrhizin 함량

No.	Sample Retention time	함량 (mg/g)				
		Sample 1	Sample 2	Sample 3	평균	표준편차
1	11.35 (liquiritin)	12.56	12.68	12.7	12.64	0.35
2	27.81 (glycyrrhizin)	38.10	39.80	36.51	38.13	1.12

2) 캡슐에 함유하고 있는 liquiritin / glycyrrhizin



<그림> 캡슐 안에 함유하고 있는 liquiritin / glycyrrhizin의 HPLC chromatograph

<표> 캡슐에 함유하고 있는 liquiritin / glycyrrhizin 함량

Sample		함량 (mg/capsule)				
No.	Retention time	Sample 1	Sample 2	Sample 3	평균	표준편차
1	11.45 (liquiritin)	0.53	0.52	0.55	0.53	0.02
2	27.83 (glycyrrhizin)	1.59	1.65	1.69	1.64	0.06

감초 추출물에 함유된 liquiritin의 함량은 12.64 mg/g으로 glycyrrhizin의 함량은 38.13 mg/g으로 확인됨. 생산된 제품(캡슐)에 함유된 liquiritin의 함량은 0.53 mg으로 glycyrrhizin의 함량은 1.64 mg으로 확인됨.

(5) 결론

<표> 코코넛오일과 캡슐의 Caprylic acid 함량

	코코넛 오일(표준편차)	캡슐(표준편차)	
Caprylic acid	389.63(5.52) mg/g	318.33(3.36) mg/내용물 1g 당	159.15(3.36) mg/capsule

<표> 감초물추출과 캡슐의 Liquiritin / glycyrrhizin 함량

	감초 물추출물(표준편차)	캡슐(표준편차)	
Liquiritin	12.64(0.35) mg/g	1.05(0.01) mg/내용물 1g 당	0.53(0.02) mg/capsule
glycyrrhizin	38.13(1.12) mg/g	3.27(0.09) mg/내용물 1g 당	1.64(0.06) mg/capsule

<표> 감초+코코넛오일을 혼합한 캡슐형 제품의 기준규격

지표성분	함량 기준
Caprylic acid	127.32 ~ 190.98 mg/capsule
Liquiritin	0.42 ~ 0.63 mg/capsule
glycyrrhizin	1.31 ~ 1.96 mg/capsule

함량 기준 설정 근거: 3Lot 각 지표성분 함량 평균값의 80~120%

캡슐형 제품의 caprylic acid의 기준 규격은 127.32 ~ 190.98 mg/capsule로 확인되었고, liquiritin의 기준규격은 0.42 ~ 0.63 mg/capsule이고, glycyrrhizin의 기준규격은 1.31 ~ 1.96 mg/capsule로 확인됨.

□ 안정성 연구

(1) 가속시험

- 실온(20℃ 고정) 및 40℃, 습도 75%, 단, 기울기를 확실히 하기 위해 4℃를 추가하고, 1개월 간격으로 6개월 시험함.

1) 감초+코코넛 오일 복합물(GUCO 복합물)

<표> 감초+코코넛 오일 복합물(GUCO 복합물)의 성분 시험 결과

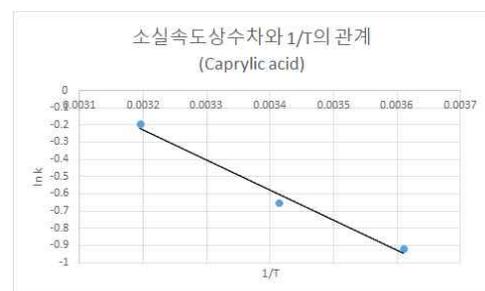
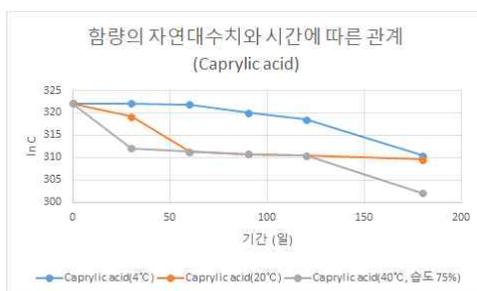
조건	4℃			실온(20℃)			40℃, 습도 75%		
기간	Caprylic acid (mg/g)	Glycyrrhizin (mg/g)	Liquiritin (mg/g)	Caprylic acid (mg/g)	Glycyrrhizin (mg/g)	Liquiritin (mg/g)	Caprylic acid (mg/g)	Glycyrrhizin (mg/g)	Liquiritin (mg/g)
초기	322.15	3.27	1.05	322.15	3.27	1.05	322.15	3.27	1.05
30일	322.18	3.25	1.03	319.18	3.19	1.02	312.18	3.12	1.06
60일	321.94	3.24	1	311.36	3.19	1	311.36	3.11	0.93
90일	320.11	3.22	1	310.86	3.1	0.96	310.86	2.91	0.91
120일	318.52	2.93	0.95	310.55	3	0.94	310.55	2.72	0.89
180일	310.54	2.8	0.95	309.64	2.72	0.91	302.13	2.51	0.81

안정성 시험결과

- ① 성상 : 이미, 이취, 이물이 없는 짙은 갈색의 고형액상.
- ② Caprylic acid : 표시량의 80~120%로 적합함.
- ③ Glycyrrhizin : 표시량의 80~120%로 적합함.
- ④ Liquiritin : 표시량의 80~120%로 적합함.

2) 감초+코코넛 오일 복합물(GUCO 복합물) 유통기한 산출

- 지표성분 함량 결과에 따라 제품의 유통기간을 다음과 같이 산출함.



우선 함량의 자연대수치를 경과 일수에 대해 plotting 하면 최소 자승법으로 각 보관 온도에 따른 3개의 직선의 방정식을 구할 수 있음(아래). 각 보관 온도에 따라 직선의 기울기로 소실 속도 상수를 구하면 다음과 같음.

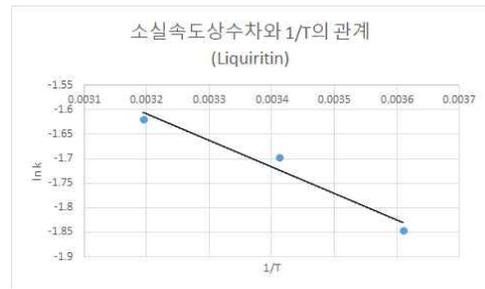
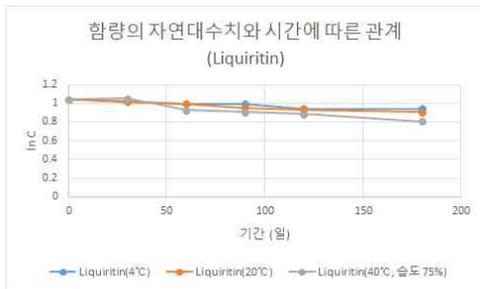
① Caprylic acid

보관 온도	회귀 방정식	속도상수(k)
4℃	$y = -0.063x + 324.28$	0.063
25℃	$y = -0.0697x + 319.53$	0.0697
40℃	$y = -0.0888x + 318.64$	0.0888



② Glycyrrhizin

보관 온도	회귀 방정식	속도상수(k)
4℃	$y = -0.0028x + 3.345$	0.0028
25℃	$y = -0.0029x + 3.3141$	0.0029
40℃	$y = -0.0043x + 3.2863$	0.0043



③ Liquiritin

보관 온도	회귀 방정식	속도상수(k)
4℃	$y = -0.0006x + 1.0443$	0.0006
25℃	$y = -0.0008x + 1.044$	0.0008
40℃	$y = -0.0014x + 1.0556$	0.0014

위에서 계산된 소실속도상수(k)와 보관온도를 사용하여 Arrhenius 식으로부터 상온에서의 유통기간을 산출함.

즉, 소실속도상수(k)의 자연대수치(ln k)를 절대온도T (273+보관온도)의 역수에 대하여 plotting 하여 최소자승법으로 계산하면 아래의 방정식을 구할 수 있음.

지표물질	회귀 방정식
Caprylic acid	$y = -831.68x + 0.2162$
Glycyrrhizin	$y = -1046.8x - 2.158$
Liquiritin	$y = -2049.9x - 0.0584$

잔존함량이 이제품의 최소 허용함량이 될 때까지의 시간(t)를 아래의 arrhenius 식으로부터 구하면

$$t = 1/k_{25} \times \ln (C_0/C) \text{ 단, } C_0 : \text{초기농도(\%), } C : \text{허용농도(\%)}$$

Caprylic acid의 상온(25℃)에서의 소실 상수는

$$\ln k_{25} = -831.68 \cdot (1/273+25) + 0.2162$$

$$\ln k_{25} = -4.7186$$

$$k_{25} = 0.0089$$

실제 함량이 표시량에 대한 기준규격의 최소허용 함량 값인 80%에 도달되는 시점은 아래와 같음.

$$t_{80} = 1/0.0089 \cdot \ln(153.91 \cdot 0.80) = \underline{24 \text{ 개월}}$$

Glycyrrhizin의 상온(25℃)에서의 소실 상수는

$$\ln k_{25} = -1046.8 \cdot (1/273+25) - 2.158$$

$$\ln k_{25} = -4.6370$$

$$k_{25} = 0.0096$$

실제 함량이 표시량에 대한 기준규격의 최소허용 함량 값인 80%에 도달되는 시점은 아래와 같음

$$t_{80} = 1/0.0096 \cdot \ln(1.64 \cdot 0.80) = \underline{23 \text{ 개월}}$$

Liquiritin의 상온(25℃)에서의 소실 상수는

$$\ln k_{25} = -2049.9 \cdot (1/273+25) - 0.0584$$

$$\ln k_{25} = -4.7612$$

$$k_{25} = 0.0085$$

실제 함량이 표시량에 대한 기준규격의 최소허용 함량 값인 80%에 도달되는 시점은 아래와 같음

$$t_{80} = 1/0.0085 \cdot \ln(0.53 \cdot 0.80) = \underline{26 \text{ 개월}}$$

- 감초+코코넛 오일 복합물(GUCO 복합물)의 유통기한 산출 결과 caprylic acid는 24개월 glycyrrhizin의 경우 23개월 liquiritin의 경우 26개월로 나타남.

3) 캡슐

〈표〉 캡슐의 성분 시험 결과

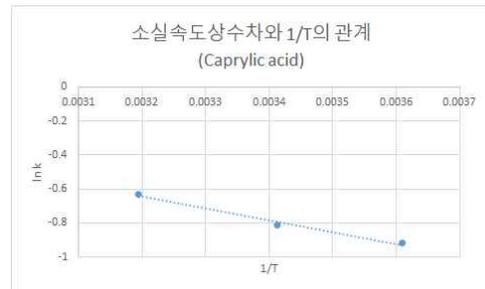
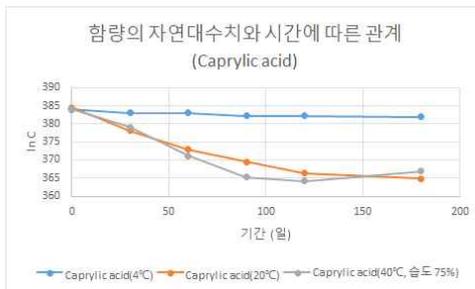
조건	4℃			실온(20℃)			40℃, 습도 75%		
기간	Caprylic acid (mg/capsule)	Glycyrrhizin (g/capsule)	Liquiritin (g/capsule)	Caprylic acid (g/capsule)	Glycyrrhizin (g/capsule)	Liquiritin (g/capsule)	Caprylic acid (g/capsule)	Glycyrrhizin (g/capsule)	Liquiritin (g/capsule)
초기	161.08	1.64	0.53	161.08	1.64	0.53	161.08	1.64	0.53
30일	161.09	1.63	0.52	159.59	1.60	0.51	156.09	1.56	0.53
60일	160.97	1.62	0.50	155.68	1.60	0.50	155.68	1.56	0.47
90일	160.06	1.61	0.50	155.43	1.55	0.48	155.43	1.46	0.46
120일	159.26	1.47	0.48	155.28	1.50	0.47	155.28	1.36	0.45
180일	155.27	1.40	0.48	154.82	1.36	0.46	151.07	1.26	0.41

안정성 시험결과

- ① 정상 : 이미, 이취, 이물이 없는 검정색의 타원형 캡슐로서 변화 없음.
- ② Caprylic acid : 표시량의 80~120%로 적합함.
- ③ Glycyrrhizin : 표시량의 80~120%로 적합함.
- ④ Liquiritin : 표시량의 80~120%로 적합함.

4) 캡슐의 유통기한 산출

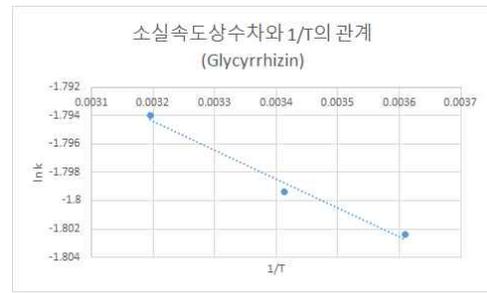
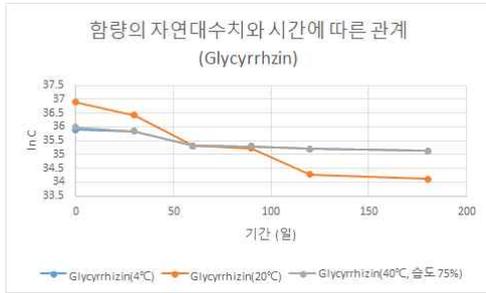
- 지표성분 함량 결과에 따라 제품의 유통기간을 다음과 같이 산출함.



우선 함량의 자연대수치를 경과 일수에 대해 plotting 하면 최소 자승법으로 각 보관 온도에 따른 3개의 직선의 방정식을 구할 수 있음(아래). 각 보관 온도에 따라 직선의 기울기로 소실 속도 상수를 구하면,

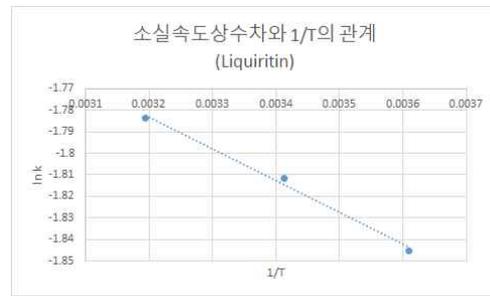
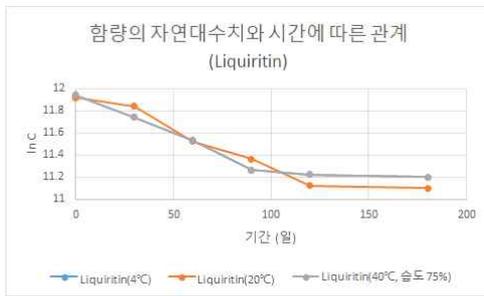
① Caprylic acid

보관 온도	회귀 방정식	속도상수(k)
4℃	$y = -0.3989x + 384.13$	0.3989
25℃	$y = -0.9426x + 381.37$	0.9426
40℃	$y = -5.3134x + 388.68$	5.3134



② Glycyrrhizin

보관 온도	회귀 방정식	속도상수(k)
4°C	$y = -0.1649x + 36.025$	0.1649
25°C	$y = -0.5854x + 37.424$	0.5854
40°C	$y = -0.1763x + 36.079$	0.1763



③ Liquiritin

보관 온도	회귀 방정식	속도상수(k)
4°C	$y = -0.158x + 12.035$	0.158
25°C	$y = -0.1834x + 12.119$	0.1834
40°C	$y = -0.158x + 12.035$	0.158

위에서 계산된 소실속도상수(k)와 보관온도를 사용하여 Arrhenius 식으로부터 상온에서의 유통 기간을 산출함.

즉, 소실속도상수(k)의 자연대수치(ln k)를 절대온도T (273+보관온도)의 역수에 대하여 plotting 하여 최소자승법으로 계산하면 아래의 방정식을 구할 수 있음.

지표물질	회귀 방정식
Caprylic acid	$y = -1793.06x + 1.5717$
Glycyrrhizin	$y = -900.44x - 1.729$
Liquiritin	$y = -997.44x - 1.3113$

잔존함량이 이제품의 최소 허용함량이 될때까지의 기간(t)를 아래의 arrhenius 식으로부터 구하면,

$$t = 1/k_{25} \times \ln (C_0/C) \text{ 단, } C_0 : \text{초기농도(\%), } C : \text{허용농도(\%)}$$

Caprylic acid의 상온(25℃)에서의 소실 상수는

$$\ln k_{25} = -1793.06 \cdot (1/273 + 25) + 1.5717$$

$$\ln k_{25} = -4.90144$$

$$k_{25} = 0.00744$$

실제 함량이 표시량에 대한 기준규격의 최소허용 함량 값인 80%에 도달되는 시점은 아래와 같음.

$$t_{80} = 1/0.00744 \cdot \ln(153.91 \cdot 0.80) = \underline{30 \text{ 개월}}$$

Glycyrrhizin의 상온(25℃)에서의 소실 상수는

$$\ln k_{25} = -900.44 \cdot (1/273 + 25) - 1.729$$

$$\ln k_{25} = -4.97968$$

$$k_{25} = 0.006876$$

실제 함량이 표시량에 대한 기준규격의 최소허용 함량 값인 80%에 도달되는 시점은 아래와 같음.

$$t_{80} = 1/0.006876 \cdot \ln(1.64 \cdot 0.80) = \underline{32 \text{ 개월}}$$

Liquiritin의 상온(25℃)에서의 소실 상수는

$$\ln k_{25} = 997.44 \cdot (1/273 + 25) - 1.3113$$

$$\ln k_{25} = -4.91216$$

$$k_{25} = 0.007356$$

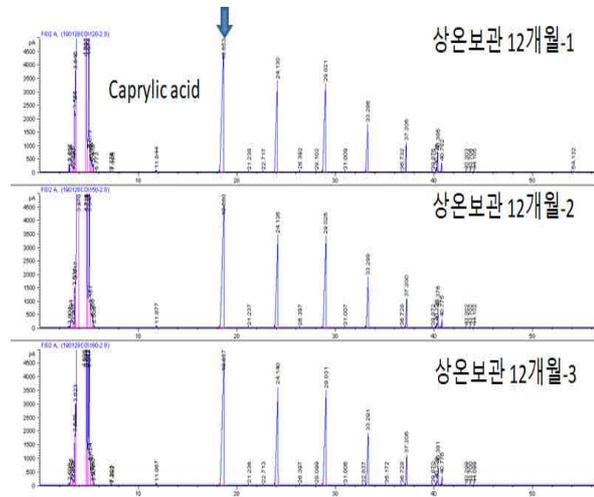
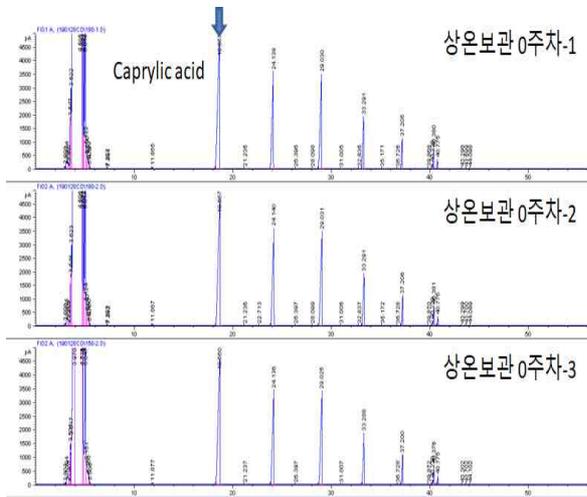
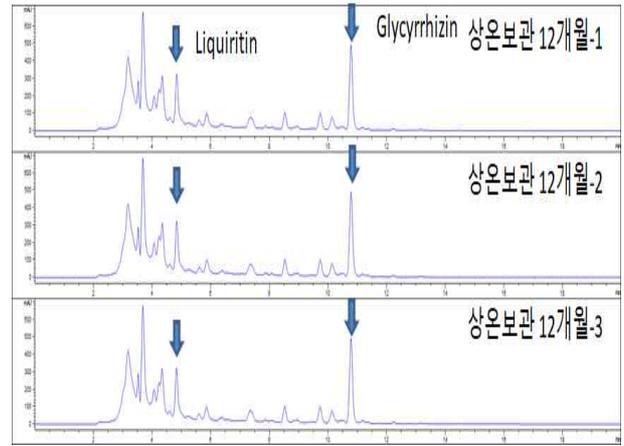
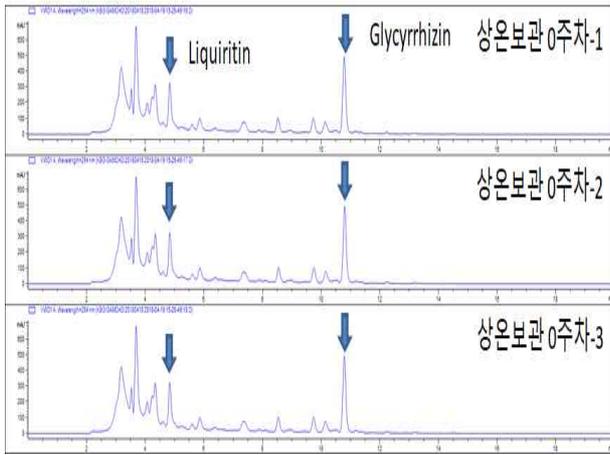
실제 함량이 표시량에 대한 기준규격의 최소허용 함량 값인 80%에 도달되는 시점은 아래와 같음.

$$t_{80} = 1/0.007356 \cdot \ln(0.53 \cdot 0.80) = \underline{30 \text{ 개월}}$$

- 캡슐의 유통기한 산출 결과 caprylic acid는 30개월 glycyrrhizin의 경우 32개월 liquiritin의 경우 30개월로 나타남.

(2) 장기보존시험

- 캡슐을 실온(20℃ 고정)에서 보관, 0개월과 12개월 함량 차이를 확인함.



구분	0개월	12개월
Caprylic acid	161.08 mg/capsule	150.21 mg/capsule
Glycyrrhizin	1.64 mg/capsule	1.45 mg/capsule
Liquiritin	0.53 mg/capsule	0.42 mg/capsule

- 실온(20℃ 고정)에서 12개월 보관 된 캡슐의 caprylic acid의 함량은 150.21 mg/capsule, glycyrrhizin의 함량은 1.45 mg/capsule, liquiritin의 함량은 0.42 mg/capsule 로 모두 기준규격 범위 내에 있는 것으로 확인됨.

다. 국산감초와 코코넛오일의 혈중중성지방 개선 및 혈관기능강화 효능 평가 및 기전연구 [협동기관 2]

□ 고지방식이로 유도된 고지혈증 동물모델 확립

본 연구의 1차년도 최종목표는 in vitro에서의 GUCO의 효능 평가이었으나 선행연구 및 reference를 참고하여 coconut oil의 성상 때문에 in vitro에서 treatment가 어려워 방향을 in vivo로 전환함. in vivo animal model 구축함

본 연구에서의 목적은 이상지질혈증에서의 GUCO의 효능 평가로서 이상지질혈증을 유발하기 위해 C57BL6/J mice를 선정하여 60% High-fat diet를 제공하였고, 이에 대조군으로서 10% low-fat diet를 제공함. 또한, coconut oil을 제공함에 있어 oil energy 칼로리를 동일하게 하는 대조군 oil로 sunflower oil을 선정하여 제공함. sunflower oil을 선정한 이유는 coconut oil의 성상이 medium chain-fatty acid lipid로 효능이 있다는 선행보고들에 따라 이와 관련없는 long chain-fatty acid lipid로서 선정하였고, 칼로리는 동일함에 초점을 둠.

즉, 본 연구를 위한 animal model의 design으로서 아래와 같은 grouping을 실시함.

groups	Normal diet	60% high-fat diet						
		-	SFO	SFO +0.6 mg GU	CO	CO +30 mg GU	CO +60 mg GU	CO +0.3 mg GU(e)

협동기관 1에서부터 제공받은 GUCO는 총 4가지의 종류로서 감초를 coconut oil에 용출시켜 획득한 추출물을 30/60 mg으로 각각 동물에게 위내투여함. 또다른 추출물로서 감초에 있는 독성 성분인 glycyrrhizin을 제거한 비극성 추출물을 0.3/0.6 mg으로 각각 동물에게 위내투여함. 본 실험을 8주간 진행함.

□ 코코넛오일과 국산감초비극성 추출물의 최적 효력비율 확보

현재 진행중인 동물실험은 8주간 진행하지만 중간시점인 4주차에 각 동물의 body weight, gained body weight, daily feed intake, feed efficiency ratio, 혈중지질지표 등을 분석하여 아래와 같이 결과를 도출함.

아래 표에서 본 결과에서는 각 실험동물들의 체중과 체중증가량, 하루 음식 섭취량, 식이효율 등을 분석한 결과이며, 60% high-fat diet를 제공한 실험동물군에서 체중증가량이 10% low-fat diet를 제공한 실험동물군보다 뚜렷하게 증가한 것을 확인함. 그러나 하루섭취 식이량은 10% low-fat diet를 제공한 실험동물군보다 60% high-fat diet를 제공한 실험동물군에서 감소하는 것을 확인하였고, 특히 sunflower oil을 제공한 모든 그룹에서 60% high-fat diet만 제공한 실험동물군보다 더 감소하는 것을 확인하였음. 그리고 coconut oil을 제공한 그룹은 60% high-fat diet만 제공한 실험동물군보다 증가하였고 CO+0.3mg GU(e)그룹에서만 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있음.

<표> Basic information for the C57BL6/J mouse (1)

groups	Normal diet	60% high-fat diet							
		-	SFO	SFO +0.3 mg GU	CO	CO +30 mg GU	CO +60 mg GU	CO +0.15 mg GU(e)	CO +0.3 mg GU(e)
Body weight (g) -0 week	20.6±0.400 ^{ab}	20.6±0.245 ^{ab}	20.4±0.245 ^{ab}	21.4±0.245 ^a	21.4±0.245 ^a	20.0±0.316 ^b	20.4±0.510 ^{ab}	20.8±0.374 ^{ab}	20.4±0.245 ^{ab}
Body weight (g) -4 weeks	21.8±0.374 ^b	26.0±0.316 ^a	25.0±0.316 ^a	25.8±0.800 ^a	26.4±0.510 ^a	24.6±0.600 ^a	25.4±0.748 ^a	25.8±0.735 ^a	24.8±0.374 ^a
Body weight (g) -8 weeks	26±0.837 ^c	31.6±1.249 ^{ab}	29.6±0.748 ^b	30.6±0.872 ^b	34.2±0.872 ^a	29±1.378 ^{bc}	30.4±1.364 ^b	31.2±1.685 ^{ab}	29.4±0.872 ^{bc}
Gained body weight (g)	5.4±0.812 ^b	11±1.034 ^a	9.2±0.800 ^a	9.2±0.663 ^a	12.8±1.020 ^a	9±1.673 ^a	10±1.304 ^a	10.4±1.568 ^a	9±1.049 ^a
Food intake (g/day)	3.168±0.022 ^a	2.508±0.034 ^a	2.295±0.052 ^c	2.332±0.047 ^c	2.673±0.087 ^b	2.357±0.062 ^c	2.457±0.041 ^{c,d}	2.522±0.069 ^{ab}	2.335±0.055 ^c
FER (%)	2.298±0.334 ^b	5.9±0.634 ^a	5.393±0.377 ^a	5.313±0.305 ^a	6.450±0.390 ^a	5.111±0.890 ^a	5.513±0.736 ^a	5.549±0.792 ^a	5.164±0.528 ^a

<표> Basic information for the C57BL6/J mouse (2)

Groups (unit; mg/dl)	Normal diet	60% high-fat diet							
		-	SFO	SFO +0.3 mg GU(e)	CO	CO +30 mg GU	CO +60 mg GU	CO +0.15 mg GU(e)	CO +0.3 mg GU(e)
Triglycerides (TG)	49±7.649 ^b	74±7.649 ^{ab}	62±5.339 ^{ab}	54±7.649 ^b	63±8.803 ^{ab}	86±5.612 ^a	92±14.089 ^a	70±9.566 ^{ab}	75±14.714 ^{ab}
Total cholesterol (TC)	106±2.819 ^b	154.667±15.613 ^a	154.667±6.884 ^a	164.667±5.977 ^a	172.367±29.611 ^a	150.333±9.704 ^{ab}	141.667±12.839 ^{ab}	144.667±10.924 ^a	159.667±7.390 ^a
Free-cholesterol (FC)	16.5±0.858 ^c	22.833±1.537 ^{ab}	24.5±2.189 ^{ab}	22.5±0.726 ^b	27.667±1.219 ^a	22.5±1.911 ^b	24.5±1.748 ^{ab}	21.5±1.481 ^b	25±1.481 ^{ab}
Cholesterol ester (CE)	89.5±2.643 ^b	131.833±15.043 ^a	130.167±8.504 ^{ab}	142.167±5.550 ^a	144.7±29.092 ^a	127.833±8.013 ^{ab}	117.167±11.358 ^{ab}	123.167±10.187 ^a	134.667±6.696 ^a
LDL-cholesterol	49.231±2.013 ^d	81.769±0.756 ^{bc}	76.538±5.724 ^b	80.231±4.386 ^{bc}	89.769±4.710 ^{bc}	76.077±4.481 ^c	89.692±5.236 ^a	85.462±3.615 ^{bc}	98.5±3.983 ^a
HDL-cholesterol	77.667±2.261 ^d	99.667±4.714 ^{bc}	97.667±2.953 ^c	106.333±5.578 ^{bc}	123±4.503 ^a	99±5.617 ^{bc}	112.667±5.538 ^a	107.333±4.732 ^{bc}	107.333±3.930 ^{bc}

위 표에서 본 결과에서는 각 실험동물들의 혈중 triglycerides(TG), total cholesterol(TC), free-cholesterol(FC), cholesterol ester(CE), LDL-cholesterol, HDL-cholesterol을 측정하여 분석한 결과임. TG, TC, FE, CE, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol 모두 10% low-fat diet을 제공한 실험동물군보다 60% high-fat diet을 제공한 실험동물군에서 현저히 높게 나왔으며, TG는 SFO+0.3mg GU(e) 그룹에서만 10% low-fat 수준으로 낮아진 것을 확인하였고, TC는 CO+30mg GU, CO+60mg

GU, CO+0.15mg GU(e) 그룹에서 60% high-fat diet을 제공한 실험동물군보다 감소한 것을 확인하였고, FC는 SFO+0.3 mg GU(e), CO+30mg GU, CO+0.15mg GU(e) 그룹에서 60% high-fat diet을 제공한 실험동물군보다 감소한 것을 확인함. 또한 LDL은 CO+30mg GU에서만 60% high-fat diet을 제공한 실험동물군보다 감소한 것을 확인하였고, HDL은 SFO그룹에서 60% high-fat diet을 제공한 실험동물군보다 감소하였고, CO에서는 60% high-fat diet을 제공한 실험동물군보다 현저히 증가하였고 그룹간에서 가장 높은 수치를 나타내었음.

결과적으로 Oil을 제공하는 실험동물군에서는 식이섭취량이 현저히 낮아졌으나 체중의 증가율은 일정함으로써 coconut oil과 GUCO의 제공이 현재까지는 체중의 감소 등의 항비만 효능을 나타내지는 않음을 알 수 있었음. 또한 혈중지질 마커들을 확인 한 결과, 코코넛오일과 감초 추출물을 섭취한 그룹에서 TC, FC, CE 등 통계적으로 감소하는 경향이 나왔지만, 실질적으로는 큰 차이가 나지 않는다고 판단됨.

□ 고지방 식이 유도 고지혈증 동물실험 모델을 이용한 GUCO의 혈중지질개선 효능 검증

본 연구에서의 목적은 이상지질혈증에서의 GUCO의 효능 평가로서 이상지질혈증을 유발하기 위해 C57BL6/J mice를 선정하여 45% High-fat diet를 제공하였고, 이에 대조군으로서 10% fat diet를 제공함. 또한, GUCO를 제공함에 있어 oil energy 칼로리를 동일하게 하는 대조군 oil로 coconut oil을 선정하여 제공함.

즉, 본 연구를 위한 animal model의 design으로서 아래와 같은 grouping을 실시함.

groups		
10% high-fat diet	45% high-fat diet	
-	coconut oil(CO)	GUCO

협동기관 1에서부터 제공받은 GUCO는 감초를 coconut oil에 용출시켜 획득한 추출물을 10주 동안 20 mg/kg으로 동물에게 위내 투여함.

최적 혼합비율을 확립한 GUCO를 고지혈증 동물 모델에서 확인함.

<표> Basic information for the C57BL6/J mouse (3)

BW(g)	0w	10wks	Δ
HF 10%	24.10±0.43	30.20±0.99	6.10±0.85 ^c
HF 45%	24.20±0.44	39.10±1.33	14.90±1.27 ^a
CO	24.22±0.46	35.67±0.91	11.44±0.90 ^b
GUCO	24.44±0.38	34.11±1.29	9.67±1.13 ^b

위 표에서 본 결과에서는 45% high fat을 섭취한 생쥐에서는 2배 이상 체중이 증가하였는데 coconut oil을 투여한 생쥐에서 유의적인 체중감소를 보였고, 여기에 감초가 혼합된 coconut oil (GUCO)에서 체중감소의 경향을 나타내었음.

<표> Basic information for the C57BL6/J mouse (4)

	total calorie intake(kcal)	EER(%)
HF 10%	807.35±13.93 ^c	0.76±0.10 ^c
HF 45%	947.89±18.68 ^a	1.59±0.16 ^a
CO	903.36±30.63 ^{ab}	1.28±0.11 ^{ab}
GUCO	877.09±22.22 ^b	1.10±0.12 ^{bc}

10주동안 섭취한 오일과 식이 섭취량의 총 열량과 그에 따른 식이효율을 분석한 결과임. 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐에서는 10% fat diet를 제공한 실험동물군보다 2배 이상 체중이 증가하였는데(Basic information for the C57BL6/J mouse(4)), energy efficiency ratio (EER)도 2배 이상의 유사한 결과를 나타내었음. 총 섭취한 열량이 10% fat diet를 제공한 실험동물군보다 45% high-fat diet를 제공한 실험동물군에서 월등히 많이 섭취한 것을 확인함. coconut oil을

투여한 생쥐에서 EER의 감소를 보였고, 여기에 감초가 혼합된 coconut oil (GUCCO)에서 유의적인 EER 감소를 나타내었는데 감초를 혼합한 coconut oil의 체중증가를 위한 energy의 효율이 감소된 것을 알 수 있었음.

〈표〉 Basic information for the C57BL6/J mouse (5)

Diets	Groups	Triacylglyceride (TG)	Total cholesterol (TC)	Very low density Lipoprotein (VLDL)	LDL-cholesterol	HDL-cholesterol
10%HF	-	167.90±11.77 ^{ab}	170.11±4.58 ^b	33.58±2.35 ^{ab}	115.13±5.19 ^b	88.55±3.03 ^b
	-	185.30±5.09 ^a	227.93±7.52 ^a	37.06±1.02 ^a	153.55±6.97 ^a	111.45±1.89 ^a
45%HF	CO	185.54±10.17 ^a	236.79±11.88 ^a	37.11±2.03 ^a	170.15±12.30 ^a	103.75±3.85 ^a
	GUCCO	143.28±5.31 ^b	187.14±4.47 ^b	28.66±1.06 ^b	125.17±4.27 ^b	90.63±1.56 ^b

Unit: mg/dl, n=7-10

각 실험동물들의 혈중 triglycerides(TG), total cholesterol(TC), very low density lipoprotein(VLDL), LDL-cholesterol, HDL-cholesterol을 측정하여 분석한 결과임. 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐에서는 중성지방의 혈중농도가 유의적으로 증가하였는데 coconut oil을 투여한 생쥐에서 혈중농도의 감소가 없었지만, 감초를 혼합한 coconut oil은 현저한 감소를 나타냄. 총콜레스테롤과 VLDL의 혈중농도도 중성지방 연구결과와 유사하게 모두 10% fat diet을 제공한 실험 동물군 보다 현저히 높게 나왔음. TC와 VLDL의 혈중농도가 감초를 혼합한 coconut oil(GUCCO)을 투여한 생쥐에서 현저히 감소함. 총콜레스테롤에서 LDL의 콜레스테롤은 감초를 혼합한 coconut oil을 투여한 생쥐에서 유의적으로 감소하여 혈중지질을 개선하였다고 보지만, HDL의 콜레스테롤도 유의적인 감소를 보여 개선되어야 할 사항으로 보임.

〈표〉 Basic information for the C57BL6/J mouse (6)

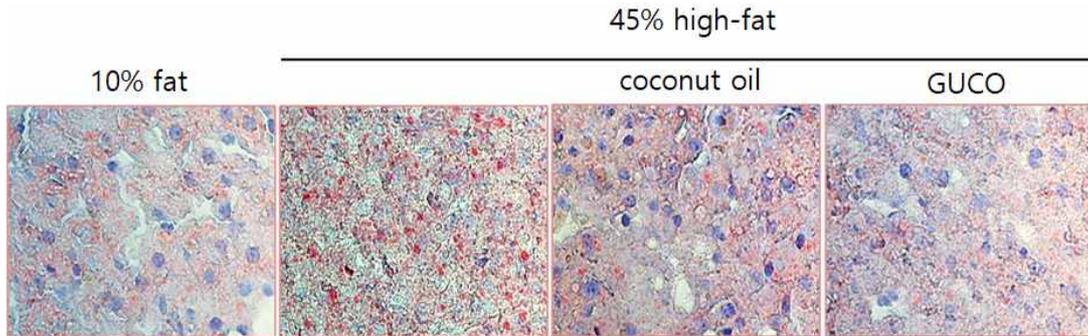
Diets	Groups	후복강 지방	피하 지방	내장 지방	부고환 지방	갈색 지방
10%HF	-	0.227±0.038 ^b	0.402±0.056 ^c	0.261±0.046 ^b	0.746±0.099 ^c	0.133±0.012 ^b
	-	0.721±0.101 ^a	1.167±0.107 ^a	0.668±0.114 ^a	2.281±0.219 ^a	0.207±0.022 ^a
45%HF	CO	0.633±0.057 ^a	0.871±0.122 ^b	0.424±0.046 ^b	1.779±0.151 ^b	0.153±0.013 ^b
	GUCCO	0.745±0.082 ^a	0.782±0.076 ^b	0.409±0.074 ^b	1.626±0.143 ^b	0.165±0.014 ^{ab}

Unit: g

각 실험동물들의 장기적출을 통한 무게를 측정한 것임. 본 결과에서 신장, 췌장, 심장, 비장의 무게는 모든 실험동물군에서 비슷한 무게가 측정되었음. 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐의 신장, 췌장 및 비장의 무게는 10% fat을 섭취한 생쥐에 비해서 유의적인 변화는 없었음. 간 무게에서는 coconut oil을 투여한 생쥐에서 유의적인 감소를 나타내었는데 이로서 간조직의 비대(hypertrophy)의 흔적은 없다고 봄.

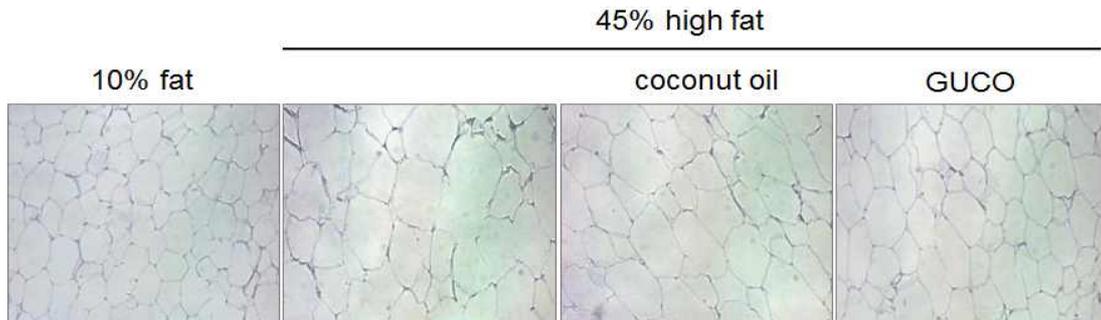
또한 심장무게에서도 감초를 혼합한 coconut oil (GUCCO)을 투여한 생쥐에서 유의적인 감소를 보이므로 심장조직의 비대는 초래되지 않았음. 후복강 지방, 내장 지방, 갈색지방은 10% fat diet을 제공한 실험동물군보다 45% high-fat diet을 제공한 실험동물군의 지방축적이 증가된 것을 확인하였고, coconut oil과 GUCCO를 섭취한 실험동물군에서는 45% high-fat diet을 제공한 실험동물군의 지방축적과 비슷한 결과를 확인함. 그러나 피하지방, 부고환지방, 내장지방은 CO와 GUCCO를 섭취한 실험동물군에서는 45% high-fat diet을 제공한 실험동물군보다 지방축적이

감소된 것을 확인함.



<그림> Liver histopathology

각 실험동물들의 간을 적출하여 4% formaldehyde에 고정을 한 후 frozen section을 하여 oil red O stain을 통하여 지방 축적을 확인함. 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐의 간은 10% fat을 섭취한 생쥐에 비해서 지방축적이 많이 되었고 지방구의 크기도 커진 것을 확인함. 하지만 coconut oil과 감초를 혼합한 coconut oil(GUCO)를 투여한 생쥐에서는 지방구의 크기와 지방축적이 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐보다 감소한 것을 확인하였고, coconut oil를 투여한 생쥐보다 GUCO를 투여한 생쥐에서 지방축적과 지방구크기의 감소를 확인함.

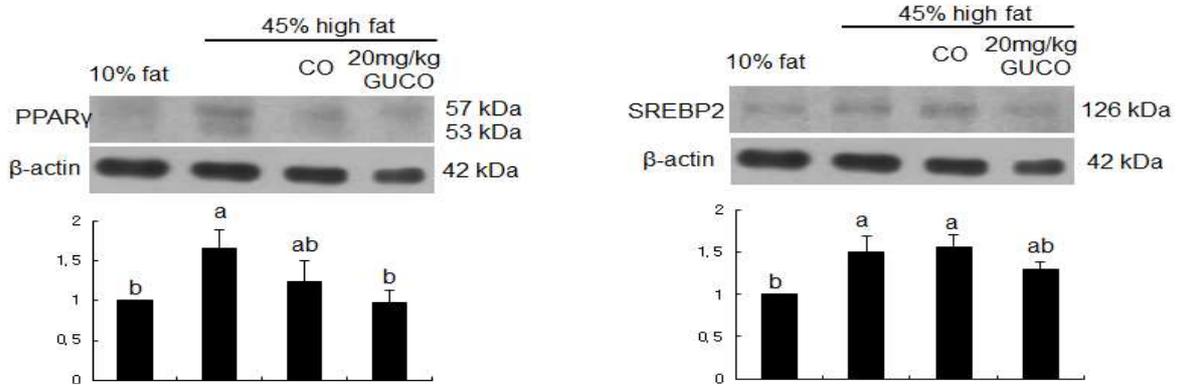


<그림> Adipocyte histopathology

각 실험동물들의 부고환지방을 적출하여 4% formaldehyde에 고정을 한 후 paraffin section을 하여 H&E stain을 통하여 지방구 크기를 확인함. 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐의 지방구는 10% fat을 섭취한 생쥐에 비해서 지방구 크기가 비대해진 것을 확인함. 하지만 coconut oil과 감초를 혼합한 coconut oil(GUCO)를 투여한 생쥐에서는 지방구의 크기가 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐보다 감소한 것을 확인하였고, coconut oil를 투여한 생쥐보다 GUCO를 투여한 생쥐에서 지방구 크기의 감소를 확인함.

결론적으로, 45% high-fat diet로 유도한 고지혈증 동물모델에서 GUCO를 제공하는 실험동물군은 body weight, 식이섭취량, 식이효율의 감소와 TG, TC, VLDL, LDL-cholesterol의 감소로 보아 혈중지질개선에 효능이 있는 것을 확인함. 또한, 피하지방, 부고환지방, 내장지방 등의 감소로 보아 혈중지질을 개선으로 인한 항비만 효능이 있다고 판단됨.

□ 고지혈증 동물 모델에서 콜레스테롤 역수송에 대한 바이오마커 확인 및 기전 연구



고지방 식이로 유도한 고지혈증 실험동물에서 간을 적출하여, 20mg 간조직을 1mL의 lysis buffer에 homogenization하여 각 조직의 샘플을 확보하여 western blot을 통하여 단백질 발현을 확인함.

PPAR γ 의 발현을 확인해본 결과, 10% fat을 섭취한 생쥐보다 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐에서 발현이 증가한 것을 확인함. coconut oil과 감초를 혼합한 coconut oil(GUCO)를 투여한 생쥐에서는 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐보다 발현이 감소한 것을 확인하였고, coconut oil를 투여한 생쥐보다 GUCO를 투여한 생쥐에서 발현이 감소하여 10% fat을 섭취한 생쥐만큼 단백질 발현의 감소를 확인함.

또한, SREBP2의 발현을 확인해본 결과, 10% fat을 섭취한 생쥐보다 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐에서 발현이 증가한 것을 확인함. coconut oil을 섭취한 생쥐에서는 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐와 유의적 차이가 없었으며, 감초를 혼합한 coconut oil(GUCO)를 투여한 생쥐에서는 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐보다 발현이 감소한 것을 확인함.

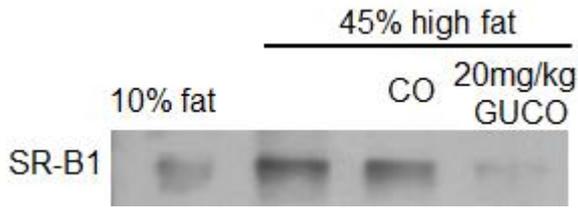
결론적으로, 45% high-fat diet로 유도한 고지혈증 동물모델에서 GUCO를 제공하는 실험동물군은 Fatty acid storage, glucose metabolism 조절인자인 PPAR γ 와 지방산 생합성에 관여하는 SREBP2의 단백질 발현의 감소로 보아 콜레스테롤 역수송에 대한 효능이 있는 것을 확인함.

□ 고지혈증 동물모델에서 대식세포 분리하여 지방대사에 대한 바이오마커 확인

C57BL/6J 마우스를 고지방식으로 유도한 고지혈증 동물모델의 복강에 3ml의 thioglycollate medium를 주사하고 3일 후에 마우스를 마취한 후 복강에서 10ml의 PBS를 주입하여 3000rpm, 10분 동안 원심분리하여 세포를 채취함.

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)으로 pellet을 풀어준 세포를 petri dish에 seeding하고, 2시간 후에 petri dish 바닥에 붙은 세포를 제외한 나머지 세포를 세척해주고 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 바꿔주었음.

24시간 후에 lysis를 하여 단백질 샘플을 얻고 western blot assay를 통해 SR-B1을 확인함.



SR-B1의 발현을 확인해본 결과, 10% fat을 섭취한 생쥐보다 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐에서 발현이 증가한 것을 확인함. coconut oil과 감초를 혼합한 coconut oil(GUCO)를 투여한 생쥐에서는 45% high-fat diet을 섭취한 생쥐보다 발현이 감소한 것을 확인하였고, coconut oil를 투여한 생쥐보다 GUCO를 투여한 생쥐에서 발현이 감소하여 10% fat을 섭취한 생쥐만큼 단백질 발현의 감소를 확인함.

결론적으로, 45% high-fat diet로 유도한 고지혈증 동물모델에서 GUCO를 제공하는 실험동물군은 cholesterol efflux에 관여하는 SR-B1의 단백질 발현의 감소로 보아 지방대사 억제 효능이 있는 것을 확인함.

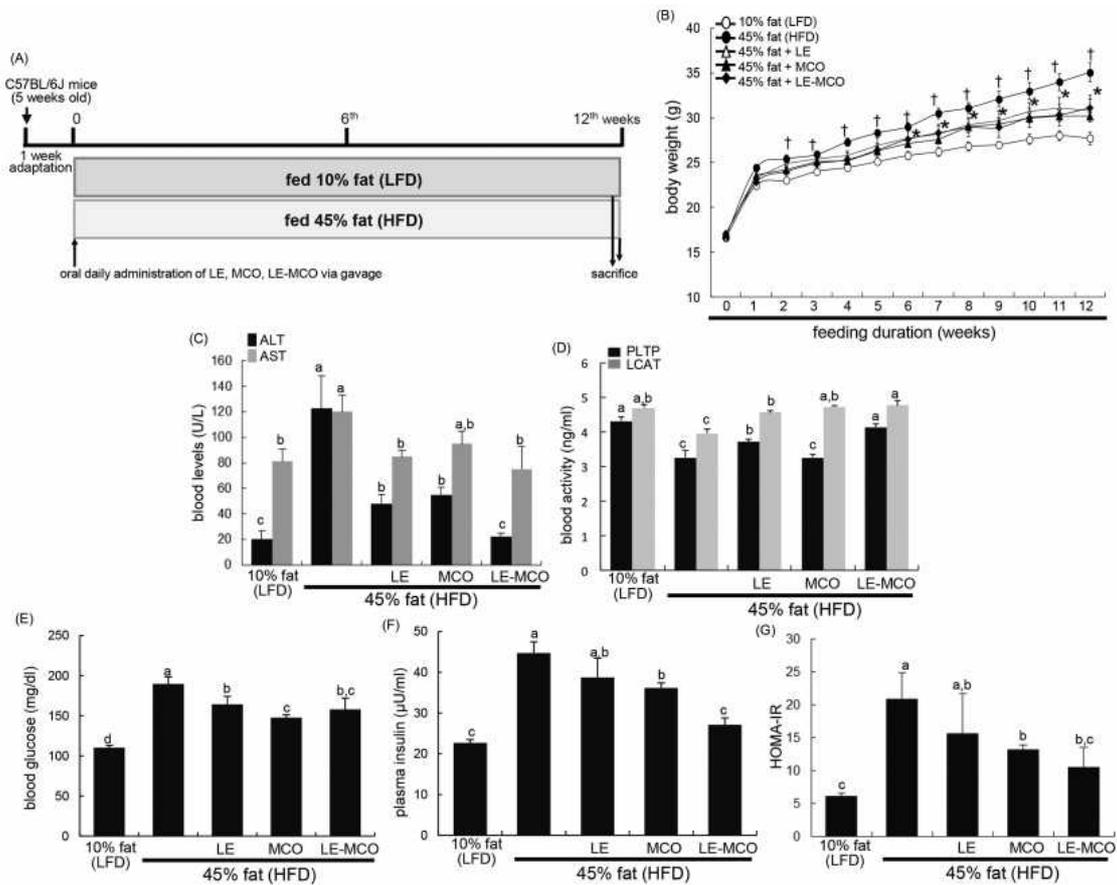
□ 고지혈증 동물모델에서 시제품 GUCO의 혈중지질개선 효과 확인

: 코코넛 오일과 감초의 최적의 혼합비율로 만들어진 GUCO의 시제품을 고지혈증 동물모델에서 확인

본 연구에서의 목적은 이상지질혈증에서의 GUCO의 효능 평가로서 이상지질혈증을 유발하기 위해 C57BL6/J mice를 선정하여 45% High-fat diet를 12주동안 제공하며, LE(감초), MCO(코코넛오일), LE-MCO(GUCO)을 경구투여를 실시하였으며, 대조군으로 10% fat diet를 제공함.

즉, 본 연구를 위한 animal model의 design으로서 아래와 같은 grouping을 실시함.

groups				
10% diet	45% high-fat diet			
-	-	LE (감초)	MCO (코코넛오일)	LE-MCO (GUCO)



위 그림은 HFD 마우스에서 LE-MCO에 의한 혈청 바이오마커를 개선을 확인함. 간독성을 유발여부를 알 수 있는 ALT 및 AST를 확인하였을 때, HFD를 섭취한 마우스에서 증가했던 수치가 LE, MCO, LE-MCO를 섭취하였을 때 감소하는 것을 확인함.

또한 HDL수치를 조절하는데 관여하는 PLTP와 LCAT은 HFD를 섭취한 마우스에서 감소하였던

수치가 LE, MCO, LE-MCO를 섭취하였을 때 증가하였고, 특히 LE, MCO보다 LE-MCO를 섭취하였을 때 수치가 크게 향상시킴.

HFD 마우스에서 증가하였던 혈당과 인슐린농도가 LE, MCO, LE-MCO를 섭취하였을 때 감소하는 것을 확인하였고, 인슐린농도는 LE-MCO를 섭취 시 가장 크게 감소하는 것을 확인하였음. 이러한 결과로 LE-MCO는 HFD에 의해 증가된 인슐린저항성값(HOMAIR)을 감소시켜 인슐린 저항성을 개선시킴.

: 고지혈증 동물모델에서 시제품 GUCO의 혈중지질개선 효과 확인

group	initial body weight (g)	final body weight (g)	Δweight (g)	group	food intake		
					food efficiency ratio (%)	total calories intake (kcal)	energy efficiency ratio (%)
10% dietary fat	16.60 ± 0.27	27.70 ± 0.73	11.10 ± 0.50 ^c	10% dietary fat (LFD)	4.30 ± 0.26 ^c	1005.24 ± 38.36 ^b	1.12 ± 0.07 ^b
45% dietary fat	16.70 ± 0.27	35.10 ± 1.10	18.40 ± 1.15 ^d	45% dietary fat (HFD)	7.91 ± 0.58 ^a	1110.13 ± 42.84 ^a	1.67 ± 0.12 ^a
LE	16.50 ± 0.27	30.80 ± 1.27	14.30 ± 1.17 ^b	LE	6.64 ± 0.50 ^b	1019.98 ± 12.40 ^b	1.40 ± 0.12 ^{ab}
MCO	17.00 ± 0.30	30.22 ± 0.36	13.22 ± 0.49 ^b	MCO	5.44 ± 0.65 ^b	1054.00 ± 27.98 ^{ab}	1.14 ± 0.14 ^b
LE-MCO	17.00 ± 0.34	31.11 ± 1.38	14.11 ± 1.09 ^b	LE-MCO	6.12 ± 0.42 ^b	1040.60 ± 29.04 ^b	1.28 ± 0.09 ^b

위 표를 보면 HFD는 LFD보다 체중이 증가하였으며 LE, MCO, LE-MCO를 섭취하였을 때 감소함. 또한 food efficiency ratio, total calories intake, energy efficiency ratio를 비교하였을 때 LE, MCO, LE-MCO를 섭취하였을 때 증가된 값의 HFD 마우스보다 감소함.

group	weight (g)				
	kidney	heart	pancreas	spleen	liver
10% fat (LFD)	0.426 ± 0.007 ^b	0.130 ± 0.002 ^a	0.203 ± 0.022 ^c	0.100 ± 0.004 ^b	1.018 ± 0.067 ^b
45% dietary fat (HFD)	0.464 ± 0.014 ^a	0.127 ± 0.003 ^a	0.262 ± 0.02 ^a	0.117 ± 0.005 ^a	1.163 ± 0.027 ^a
LE	0.384 ± 0.022 ^b	0.127 ± 0.008 ^a	0.255 ± 0.034 ^{ab}	0.099 ± 0.003 ^b	1.004 ± 0.024 ^b
MCO	0.409 ± 0.018 ^b	0.126 ± 0.004 ^a	0.232 ± 0.009 ^b	0.095 ± 0.004 ^b	0.940 ± 0.017 ^b
LE-MCO	0.390 ± 0.032 ^b	0.123 ± 0.003 ^a	0.244 ± 0.028 ^{ab}	0.095 ± 0.003 ^b	0.959 ± 0.045 ^b

group	weight (g)				
	visceral fat	posterior abdominal fat	subcutaneous fat	epididymal fat	brown fat
10% fat (LFD)	0.206 ± 0.035 ^b	0.203 ± 0.071 ^d	0.293 ± 0.041 ^d	0.496 ± 0.051 ^d	0.114 ± 0.015 ^c
45% dietary fat (HFD)	0.481 ± 0.059 ^a	0.661 ± 0.064 ^a	0.874 ± 0.163 ^a	1.603 ± 0.184 ^a	0.167 ± 0.021 ^a
LE	0.288 ± 0.026 ^b	0.460 ± 0.054 ^b	0.512 ± 0.073 ^b	1.156 ± 0.163 ^b	0.172 ± 0.038 ^a
MCO	0.257 ± 0.035 ^b	0.426 ± 0.047 ^b	0.520 ± 0.089 ^b	1.086 ± 0.106 ^b	0.142 ± 0.009 ^b
LE-MCO	0.233 ± 0.046 ^b	0.323 ± 0.057 ^c	0.391 ± 0.120 ^c	0.875 ± 0.147 ^c	0.128 ± 0.023 ^c

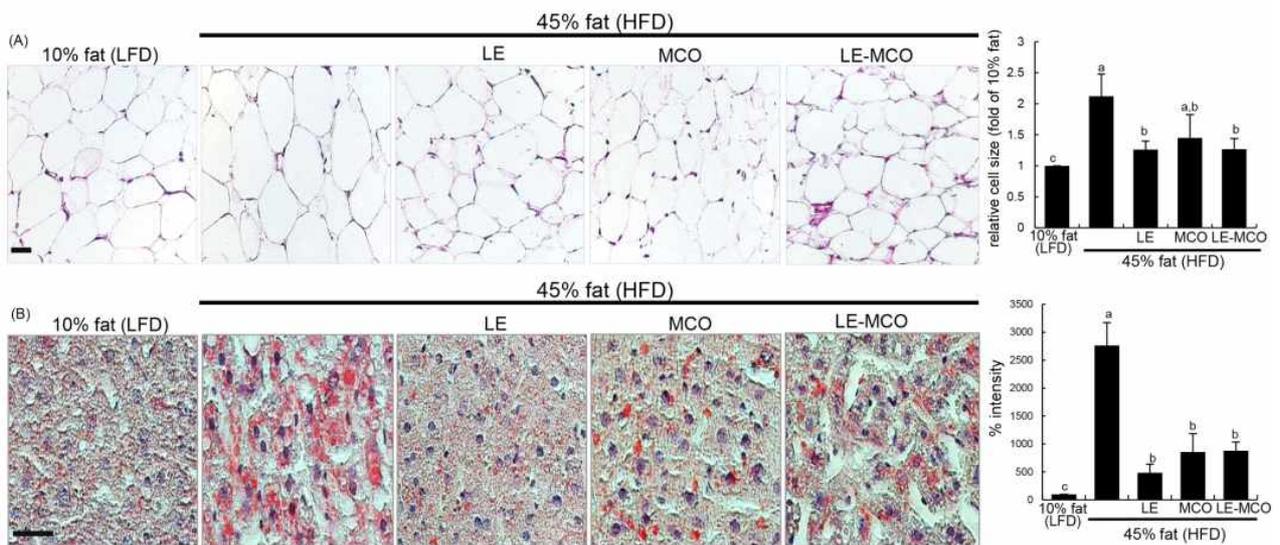
위 표는 각 그룹의 장기무게와 지방조직 무게를 비교한 수치임. 신장, 췌장, 비장, 간의 무게는 HFD를 섭취한 마우스에서 증가되었고, LE, MCO, LE-MCO를 섭취하였을 때 감소함. 특히, 간의 무게는 LE, MCO보다 LE-MCO에서 가장 낮게 나왔으며 비대해진 간이 정상수준으로 돌아온 것으로 확인함.

내장지방, 후복강지방, 피하지방, 부고환지방은 HFD 마우스에서 가장 높게 나왔으며 LE, MCO, LE-MCO를 섭취하였을 때 감소함. 특히, LE, MCO보다 LE-MCO를 섭취하였을 때 지방무게가 가장 크게 감소함.

group	lipid				
	triglyceride (TG)	total cholesterol (TC)	LDL-cholesterol (LDL-C)	VLDL-cholesterol (VLDL-C)	HDL-cholesterol (HDL-C)
10% fat (LFD)	79.0 ± 1.2 ^c	155.4 ± 2.2 ^c	74.4 ± 5.6 ^b	15.8 ± 0.2 ^c	65.0 ± 4.2 ^c
45% dietary fat (HFD)	102.9 ± 2.9 ^a	179.2 ± 5.4 ^a	83.8 ± 3.0 ^a	20.6 ± 0.6 ^a	78.1 ± 7.3 ^{a,b}
LE	89.7 ± 1.2 ^b	167.0 ± 4.5 ^b	68.2 ± 5.3 ^b	17.9 ± 0.2 ^b	80.5 ± 2.4 ^{a,b}
MCO	91.9 ± 1.2 ^b	176.2 ± 3.4 ^a	82.8 ± 6.7 ^a	18.4 ± 0.2 ^b	75.0 ± 4.3 ^b
LE-MCO	82.1 ± 1.4 ^c	168.4 ± 6.0 ^b	65.6 ± 5.9 ^b	16.4 ± 0.3 ^c	86.6 ± 5.7 ^a

위 표에서 각 실험동물들의 혈중 triglycerides(TG), total cholesterol(TC), very low density lipoprotein(VLDL), LDL-cholesterol, HDL-cholesterol을 측정하여 분석한 결과임. HFD 마우스에서는 중성지방의 혈중농도가 유의적으로 증가하였는데 LE, MCO, LE-MCO를 섭취하였을 때 감소였으며, LE, MCO보다 LE-MCO를 섭취하였을 때 지방무게가 가장 크게 감소함.

총콜레스테롤과 LDL의 혈중농도도 LFD를 제공한 마우스보다 HFD를 제공한 마우스에서 현저히 높게 나왔으며 LE와 LE-MCO를 섭취한 마우스의 농도는 감소함. 또한 VLDL의 혈중농도는 LE-MCO를 투여한 생쥐에서 LE, MCO보다 현저히 감소하였으며, HDL 콜레스테롤 농도는 LE, MCO보다 LE-MCO를 섭취하였을 때 가장 높은 농도로 측정됨. 따라서, LE-MCO이 LE, MCO보다 TG, TC, LDL, VLDL 콜레스테롤을 가장 크게 감소시켰으며 HDL 콜레스테롤도 유의적인 증가를 보이며 혈중지질개선을 확인함.

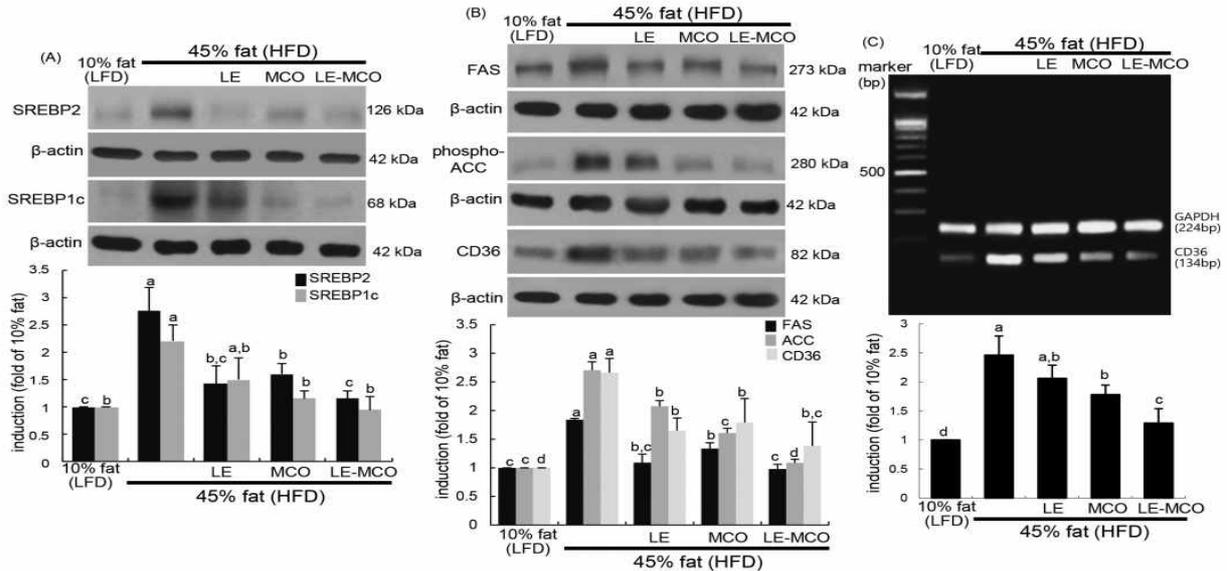


위 그림은 부고환지방의 지방크기와 간조직의 지방축적 정도를 확인함. H&E 염색을 통해 지방크기를 확인해본 결과, LFD보다 HFD에서 현저히 비대해졌으며 LE, MCO, LE-MCO를 섭취하였을 때 크기가 감소함.

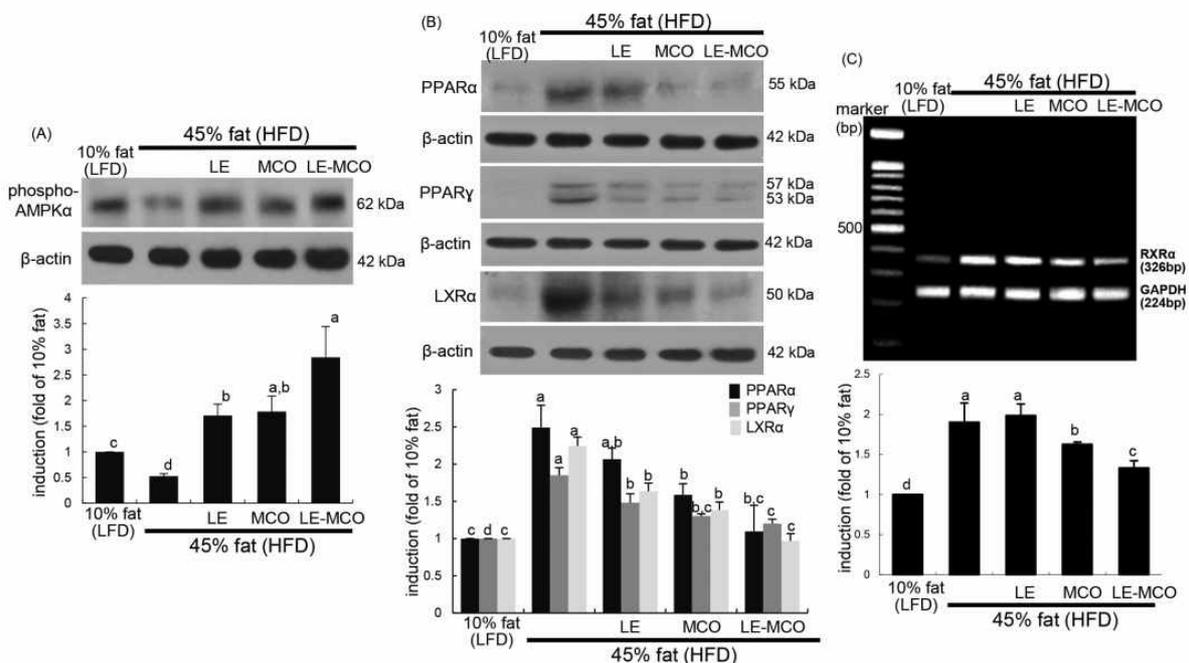
또한, 간조직의 지방축적을 알아보기 위해 Oil red O 염색을 통해 확인해본 결과, LFD보다 HFD에서 지방축적이 증가된 것을 확인하였으며 LE, MCO, LE-MCO를 섭취시 감소하는 것을 확인함. 이러한 결과는 HFD보다 LE, MCO, LE-MCO 그룹의 간조직 무게의 감소와 일치함.

□ 고지혈증 동물모델에서 시제품 GUCO의 지방합성 억제에 대한 기전 확인

: 간에서 지방합성 억제에 대한 기전 확인

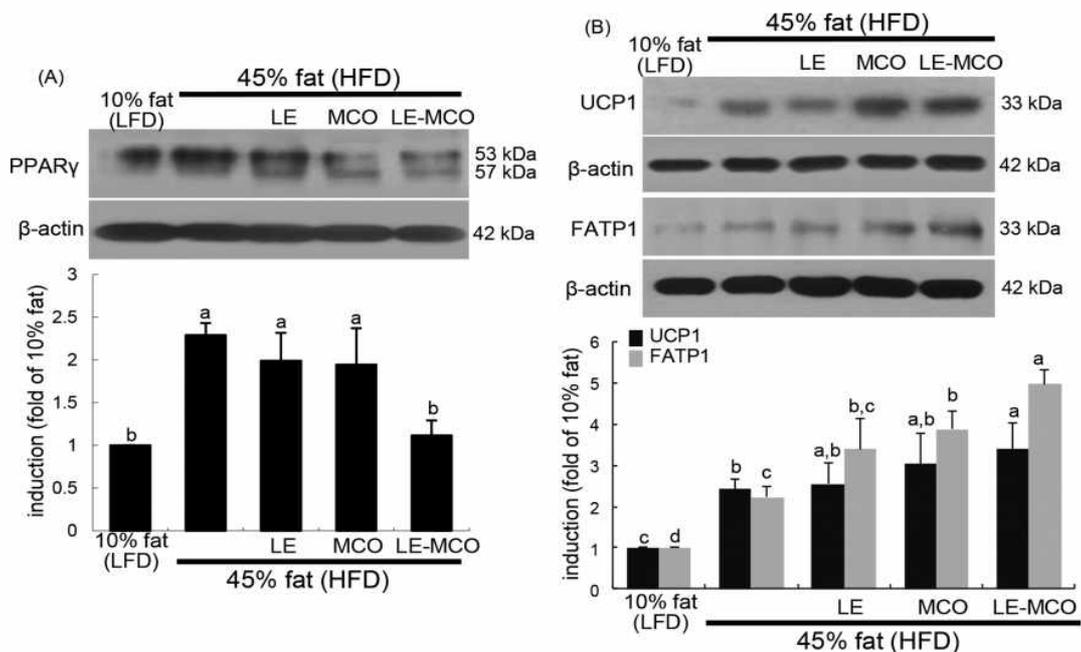


위 그림은 간조직에서 콜레스테롤 합성과 지질축적을 나타내는 바이오마커를 측정된 결과임. 간에서 triglyceride(TG)합성에 필요한 FAS와 phospho-ACC의 유도를 나타내는 SREBP1c는 HFD 마우스의 간조직에서 증가하였으며, LE, MCO, LE-MCO를 섭취하였을 때 발현이 감소하였고 FAS, phospho-ACC, CD36의 발현도 감소함. 특히, LE, MCO 마우스보다 LE-MCO를 섭취한 간 조직에서 발현이 감소하는 것을 확인함. 따라서, LE-MCO에 의한 FAS, ACC, CD36의 감소된 발현은 지방간 진행을 억제할 수 있음.



위 그림은 간조직에서 AMPK와 PPAR signaling을 통한 LE-MCO의 효과를 확인하고자 한 것임. AMPK는 에너지 요구에 반응하여 신진대사 경로를 조절하는데 핵심적인 역할을 함. HFD 마우스에서 AMPK의 간 활성화를 감소시키는 반면 LE, MCO, LE-MCO에서 활성화를 촉진시켰고 특히 LE-MCO가 가장 많이 촉진시키는 것을 확인하였음. 따라서 이상지질혈증에서 LE-MCO는 AMPK의 liver-specific activation을 통해 steatosis를 차단할 수 있음.

지방산 산화와 관련이 있는 PPAR α 와 PPAR α -LXR α 신호 전달을 확인한 결과, PPAR α 및 PPAR γ 의 간조직에서의 발현은 LFD보다 HFD에서 증가하였으며, LE, MCO, LE-MCO 섭취시 감소시켰고 특히 LE-MCO에서 발현이 가장 많이 감소시키는 것을 확인함. SREBP2에 의해 조절되는 간의 스테롤합성은 SREBP-1c에 의한 지방산 합성을 촉진하는 LXR 활성화와 결합함. 간의 LXR α 는 HFD에서 증가하였지만 LE, MCO, LE-MCO 섭취시 감소시켰고, LE-MCO는 LFD 수준으로 발현이 감소함. 또한 LXR α 의 heterodimer partner인 RXR α 의 전사도 LE-MCO에서 가장 많은 감소를 보였음. 따라서, LE-MCO는 SREBP2 및 LXR α -RXR α 의 감소를 통하여 간에서 스테롤합성의 억제하는 LE-MCO의 효능을 확인함.



위 그림은 부고환지방 조직에서 PPAR γ 의 발현을 확인하고자 함. HFD에서 증가하였던 PPAR γ 의 발현이 LE-MCO를 섭취하였을 때만 유의적으로 감소하는 것을 확인함. 갈색지방 세포의 미토콘드리아에 존재하며 에너지 소비와 에너지 대사에 관여하는 UCP1과 insulin-sensitive한 지방산 운반체인 FATP1의 발현을 확인함. 그 결과 HFD가 UCP1과 FATP1을 유도하는 것을 확인하였고, LE, MCO, LE-MCO 마우스는 HFD 마우스보다 유도가 더 많이된 것을 확인하였고, 그 중 LE-MCO가 가장 많이 유도가 되었음. 따라서 LE-MCO는 LE, MCO보다 UCP1과 FATP1을 유도하여 지방합성이 억제되어 이상혈중지질개선이 되는 것을 확인함.

결론적으로, 45% high-fat diet로 유도한 고지혈증 동물모델에서 LE(감초) 및 MCO(코코넛오일)보다 LE-MCO(GUCO)를 제공하는 실험동물군에서 AMPK와 PPAR signaling을 억제함으로써 지방대사를 억제함으로써 혈중지질개선 효능에 뛰어난 효과를 확인함.

위 결과는 Kang et al, Lipid-lowering effects of medium-chain triglyceride-enriched coconut oil in combination with licorice extracts in experimental hyperlipidemic mice. J. Agric. Food Chem. 2018, 66, 10447–10457로 SCI 국제학술지에 발표함.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 정량적 목표 및 목표 달성여부

특허 출원 3건, 디자인 등록 1건, 해외상표 등록 2건, 기술이전(기술실시) 1건, 논문 SCI급 5편 및 비SCI급 1편 등재, SCI급 1편 신청(심사 중), 학회대회 발표 6건, 인력양성 1명, 고용창출 3명을 달성함. 현재 임상시험이 진행 중임에 따라 제품화는 계획 중임.

(단위 : 건수, 백만원)

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인 증	학술성과			교육 지 도	인 력 양 성	정책 활용-홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
											SC I	비 SC I							
1 차 년 도	목표	1											1						
	실적	1											2						
2 차 년 도	목표	2										2		1					
	실적	1										2	1	2					
3 차 년 도	목표		1		1	10	1			2		2		1		2			
	실적	1	3		1	10	0			3		3		2		1			
소 계	목표	3	1		1	10	1			2		4		3		2			
	실적	3	3		1	10	0			3		5	1	6		1			

* 사업 종료 후 성과목표에 대한 부분은 생략함

* 특허등록에는 디자인 등록, 상표 등록이 포함되어 있음

[정량적 실적]

□ 특허 3건 출원, 디자인 1건 등록, 상표 2건 등록함.

출원번호	10-2016-0164667	10-2017-0144692	10-2018-0095979
발명의 명칭	감초 추출물의 제조방법 및 이로부터 얻은 항산화 활성 조성물	코코넛오일의 상온유동성 개선방법	감초 추출물 및 코코넛오일을 포함하는 복합물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 예방 또는 개선용 조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품
출원서	<p>【제제사항】</p> <p>【서유형】 특허출원서 【상조번호】 DP167454 【출원구분】 특허출원 【출원인】 특허출원 【대상】 주식회사 케이비케이치킨국영활건강 【특허고객번호】 1-2012-064045-2 【대리인】 특허법인 경인 【소재지번호】 9-2012-10002-4 【지정면역사】 배성달, 김지훈, 김형석, 이광준 【오공취임등록번호】 2016-115099-7 【발명의 국문명칭】 감초 추출물의 제조방법 및 이로부터 얻은 항산화 활성 조성물 【발명의 영문명칭】 Method For Manufacturing Glycyrrhiza Uralensis Acid Composition As Anti-oxidant Agent Comprising The Extract 【발명자】 임운성 【발명의 영문표기】 Lim, Soon Sung 【주민등록번호】 *****</p>	<p>【제제사항】</p> <p>【서유형】 특허출원서 【상조번호】 DP173940 【출원구분】 특허출원 【출원인】 한림대학교 산학협력단 【대상】 한림대학교 산학협력단 【특허고객번호】 2-2007-019517-5 【대리인】 특허법인 경인 【소재지번호】 9-2012-10002-4 【지정면역사】 배성달, 김지훈, 김형석, 이광준 【오공취임등록번호】 2014-089309-1 【발명의 국문명칭】 코코넛 오일의 상온 유동성 개선방법 【발명의 영문명칭】 Room temperature improving method of coconut oil and mixture thereof</p>	<p>【제제사항】</p> <p>【서유형】 특허출원서 【상조번호】 DP173940 【출원구분】 특허출원 【출원인】 주식회사 케이비케이치킨국영활건강 【대상】 주식회사 케이비케이치킨국영활건강 【특허고객번호】 1-2012-064045-2 【대리인】 이광준 【소재지번호】 9-2009-001191-6 【대리인】 김한경 【소재지번호】 9-2012-01085-5 【발명의 국문명칭】 감초 추출물 및 코코넛오일을 포함하는 복합물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 예방 또는 개선용 조성물 및 이를 포함하는 건강기능식품 【발명의 영문명칭】 A composition for preventing or improving blood lipid accumulation comprising a complex of licorice extract and coconut oil as an active ingredient 【발명자】 지형근 【발명의 영문표기】 Ji, Jong Gun 【주민등록번호】 781107-1000000 【우편번호】 04798</p>

등록번호	30-0977982	US5372143	US5366827
명칭	식품용기	COCOEL(29류)	COCOEL(30류)
등록증	<p>디자인등록증 CERTIFICATE OF DESIGN REGISTRATION 등록 제 30-0977982 호 등록번호 30-2017-0062460 호 출원일 2017년 12월 29일 등록일 2018년 10월 18일 등록지점 30-0977982호 발명권자 (권) 주식회사 케이비케이치킨국영활건강(1101311-*****) 사용등록지점 경인구 동일로 30(신곡2동, 왕산빌딩) 위인의 디자인은 「디자인보호법」에 따라 디자인등록원부에 등록되었음을 증명합니다. This is to certify that, in accordance with the Design Protection Act, a design has been registered at the Korean Intellectual Property Office.</p>	<p>79202166 - COCOEL Status: Live/Registered, Registered (111) Registration Number 5372143 (151) Date of the registration 02.01.2018 (210) Serial number of the application 79202166 (220) Date of filing of the application 24.11.2015 (270) Language(s) of the application English (840) Mark COCOEL (850) Indication relating to the nature or kind of mark Trademark (750) Address for correspondence Yoon S. Han, HAJIPTMAN HAN LLP, 2318 Mif Road, Suite 1400, Alexandria, VA, 22314 (721) Name and address of the applicant (Applicant) KBH Korea Health Care Co., Ltd. Corporation REPUBLIC OF KOREA, 30A, Donglin-gu, Daejeon-gu, Seoul, KR (732) Name and address of the holder of the registration (Owner) KBH Korea Health Care Co., Ltd. Corporation REPUBLIC OF KOREA, 30A, Donglin-gu, Daejeon-gu, Seoul, KR (740) Name and address of the representative (Attorney of Record) Yoon S. Han (511) The International Classification of Goods and Services for the Purpose of the Registration of Marks (Nice Classification) and the list of goods and services classified according thereto 29 (512) National classification and/or list of goods and/or services classified according thereto 046</p>	<p>79201543 - COCOEL Status: Live/Registered, Registered (111) Registration Number 5366827 (151) Date of the registration 02.01.2018 (210) Serial number of the application 79201543 (220) Date of filing of the application 24.11.2015 (270) Language(s) of the application English (840) Mark COCOEL (850) Indication relating to the nature or kind of mark Trademark (750) Address for correspondence Yoon S. Han, HAJIPTMAN HAN LLP, 2318 Mif Road, Suite 1400, Alexandria, VA, 22314 (721) Name and address of the applicant (Applicant) KBH Korea Health Care Co., Ltd. Corporation REPUBLIC OF KOREA, 30A, Donglin-gu, Daejeon-gu, Seoul, KR (732) Name and address of the holder of the registration (Owner) KBH Korea Health Care Co., Ltd. Corporation REPUBLIC OF KOREA, 30A, Donglin-gu, Daejeon-gu, Seoul, KR (740) Name and address of the representative (Attorney of Record) Yoon S. Han (511) The International Classification of Goods and Services for the Purpose of the Registration of Marks (Nice Classification) and the list of goods and services classified according thereto 30 (512) National classification and/or list of goods and/or services classified according thereto 046</p>

□ 국내외 학술회의 6건 발표함.

No	발표제목	발표일시	발표장소
1	Optimization of Solvation of Ethanol Extract of Licorice to Coconut Oil by Using Response	2016-11-24	2016 한국생약학회
2	Optimization of Coconut Oil Extraction of Bioactive Compounds from licorice by Using Response Surface Methodology	2016-11-24	2016 한국생약학회
3	Development of Optimal Extraction Conditions for Solvation of Licorice Non-polar Active Compounds in Coconut Oil using the Response Surface Methodolog	2017-08-03	2017 한국생명과학회
4	Optimization study for extraction of bioactive compounds by coconut oil	2017-06-23	2017 한국식품과학회
5	Evaluation of Acute and Subacute Toxicity of Nonpolar Licorice Root Extract in Mice	2018-10-31	2018년 한국식품영양과학회
6	An easy method for calibrating the licorice water extract content in licorice water extract-coconut oil emulsion product	2018-06-18	2018년 한국응용생명화학회

□ 인력양성 1명 달성함

본 연구 과제를 통해 국산감초와 코코넛오일 혼합소재를 이용한 혈중중성지방 개선에 대한 기능성 평가 기술에 대한 전문 인력 1명 배출함.

□ 고용창출 3명 달성함.

주관기관인 한국생활건강에서 연구원 3명을 신규로 고용 창출하였고, 연구에 참여하였음.

□ 기술이전 1건 실시함.

- 기술실시 기관: 한림대학교 산학협력단
- 기술명: 코코넛 오일의 상온 유동성 개선방법 기술에 대한 기술이전 실시하였음.

기술이전 계약서
(기술명: "코코넛 오일의 상온 유동성 개선방법")

※ 기술이전 특의 출의 정보

부 치 명	농식품부
사 업 명	고부가가치식품기술개발사업
연구개발과제명	국산감초와 코코넛오일 혼합소재를 이용한 혈중중성지방 개선 개발인정형 인삼기능성을 개발
연구기간	2018.07.07 ~ 2018.12.31
주관기관	주식회사 한국생활건강

2018년 12월 10일

한림대학교 산학협력단장 송 창 훈 (인)

[주]한국생활건강 대표이사 지 정 근 (인)

- 1 -

본 계약의 체결사실은 증명하기 위하여 계약서 2부를 작성하여 기명날인하고, "갑"과 "을"이 각각 1부를 보유한다.

2018년 12월 10일

"갑"
주 소: 강원도 원주시 한림대학교길 1
상 호: 한림대학교 산학협력단
단 장: 송 창 훈 (인)

기술이전 책임자: 한림대학교 임 순 성 (인)

"을"
주 소: 서울특별시 광진구 군자동 464-2번지
상 호: [주]한국생활건강
대표이사: 지 정 근 (인)

- 2 -

3-2. 정성적 목표 및 목표 달성여부

구분	세부연구목표	달성도(%)	연구개발 수행내용 및 결과
1차 년도	대량 생산 기술 및 생산 공정 최적화, 제조공정 표준화	100	-건강기능식품 OEM 업체 자문 -감초에탄올추출물을 분말화하여 코코넛오일에 분산시키는 방법 -추출업체 및 제형생산 업체 결정.
	혈중중성지방 개선 건강기능식품 제품개발 및 제품의 홍보, 마케팅 전략 수립	100	-코코넛오일 제품 지속적인 홍보 및 국제 출원을 통한 해외 마케팅 전략 수립
	코코넛오일과 국산감초비극성 추출물 확보 및 최적 효력비율 확보	100	-추출물 효능평가 및 코코넛오일과 국산감초비극성 추출물 확보, 효력검증 진행
	기능성 원료의 표준화	100	-영주감초 지표성분 3개 분리 및 구조 규명 (영주감초 지표성분 Dihydroglyasperin C, Dihydroglyasperin D, Isoangustone A 확보) -RSM으로 확보된 코코넛오일과 감초의 추출방법(조건) 확립
	원재료 표준화	100	-식물종 및 재배지역 : 경북 영주산으로 결정. -사용 재배 년수는 1~2년생으로 채취시기는 11월
	반응표면분석을 이용한 최적의 추출조건 확립 - 혼합 비율 도출	100	-추출혼합 비율 : 코코넛오일에 감초의 비율을 415~503 mg/mL, 추출 온도(61.3~86 ℃), 추출시간(6.6~9.3 시간)으로 조건 확보하고 특허 출원함
	고지방식으로 유도된 고지혈증 동물모델 확립	100	-2개월, 60% High-fat diet 제공을 통한 이상지질혈증 유발 동물모델 확립
	코코넛오일과 국산감초비극성 추출물의 최적 효력비율 확보	100	-최적비율로서 감초추출물의 용출에 대한 dose로서 300, 600 mg/ml과 비극성감초 추출물의 복합물 dose로서 0.3, 0.6 mg/ml을 경구투여, 효능개선에 최적 비율을 선정하는 실험
2차년도	혈중중성지방 개선에 도움을 주는 건강기능성식품 개별인정 위한 CRO 기관 선정	100	-CRO기관으로 바이오푸드씨알오 선정 및 협의
	임상시험용 시제품 개발 및 제조 (GMP시설)	100	-건강기능식품 OEM업체와 계약 체결 및 제형 검토 -코코넛오일에 감초추출분말을 균일하게 넣기 위한 방법으로 캡슐 제조하기로 결정 -감초분말 조제물 테스트 완료 -인체적용시험용 대조식품, 시험식품 제조 완료
	혈중중성지방 개선 건강기능식품 제품개발 및 제품 홍보, 마케팅 전략 수립	100	-건강기능식품 용기 및 단상자 디자인 개발 완료
	원재료 안전성 근거 확보	100	-국내 관련 규정 검토 및 전통적 사용기록 조사로 안전성 근거자료로 활용

	코코넛오일과 국산감초 추출물 확보 및 최적 효력비율 확보	100	-감초 년생 및 Glycyrrhizin acid 함량, 재배기간 검토 결과 1~2년생 감초로 선정 -감초추출물의 3T3-L1을 이용한 항비만 효능평가 실시하여 감초 물추출물로 동물실험 진행
	기준규격 지표성분 선정	100	-감초 지표성분인 glycyrrhizin과 liquiritin으로 선정(감초 물추출물) -코코넛오일 Caprylic acid로 선정
	유효물질(기능성분)의 분리, 정제 및 구조 규명	100	-open column으로 11개의 성분 분리 규명함 -HSCCC 조건으로 3개의 대량 분리가 가능함 -1H-NMR, 13C-NMR, 1H-1H COSY, DEPT, HBQC, HMBC spectroscopic data로부터 구조 규명
	고지방 식이 유도 고지혈증 동물실험 모델을 이용한 GUCO의 혈중지질개선 효능 검증	100	-C57BL/6J 마우스를 10주 동안 45% High-fat diet 제공을 통한 GUCO를 섭취함으로써 이상지질혈증 개선 검증 -45% high-fat diet 보다 GUCO 섭취 실험군에서 혈중 지질개선 마커 개선 확인
	고지혈증 동물 모델에서 콜레스테롤 역수송에 대한 바이오마커 확인 및 기전 연구	100	-고지방 식이로 유도한 고지혈증 실험동물에서 간을 적출하여, 간 조직을 lysis buffer에 homogenization하여 각 조직 샘플 확보, western blot assay 통해 지방간 유무 및 지질 개선 마커 측정
	고지혈증 동물모델에서 대식세포 분리하여 지방대사에 대한 바이오마커 확인	100	-복강 내 대식세포를 채취하여 lysis buffer로 단백질 분석
3차년도	혈중중성지방개선 IRB서류 준비 및 임상시험 실시, 개별인정 신청	85	-IRB 승인 및 임상시험(인하대병원) 실시 -개별인정 신청을 위한 IB 자료 준비 중
	식약처 검토의뢰 및 개별인정 준비, 마케팅 전략 수립	100	-식약처 인체적용시험계획서 사전검토 실시 및 IB자료 초안 작성
	기준규격 설정	100	-코코넛오일, 감초물추출물, 캡슐의 지표성분 함량 확인 -캡슐형 제품의 기준규격 설정
	안정성연구	100	-GUCO 복합물, 캡슐의 가속시험 및 유통기한 산출 -캡슐의 장기보존시험
	고지혈증 동물모델에 시제품 GUCO 복합물의 대식세포 및 간에서 지방합성 억제에 대한 기전 확인	100	-지방합성 억제 기전 확인, 관련 SCI급 논문 발표

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

현재 인체적용연구(임상시험)를 실시 중으로, 대상자는 42명 모집(30명 완료, 7명 진행 중, 5명 탈락)되어 진행 중임.

아래 식약처 가이드라인 내용의 기준을 참고하여 대상자 혈중중성지방 수치 조건을 경계수준인 150~199mg/dL 로 제한적인 설정에 따라, 실제 방문자에 비해 대상자로 선정되는 확률이 낮게 나옴. 또한 실제 방문자들의 혈중중성지방 수치 폭이 당일에 변화하는 경우도 있는 것으로 파악됨.

(건강기능식품 기능성 평가 가이드 - '혈중 중성지방 개선에 도움을 줄 수 있음' 편 -, 2016.6)

표 1. 혈중 중성지방 수준에 따른 고중성지방혈증 분류

혈중 중성지방 수치	판정 기준
<150 mg/dL	정상수준 (안전수준)
150-199 mg/dL	위험해질 수 있는 수준 (경계수준)
200-499 mg/dL	위험수준 (높은 수준)
500 mg/dL	고도위험수준 (매우 높은 수준)

출처 : 한국지질동맥경화학회, 이상지질혈증 치료지침, 2015

이와 같은 제한적인 대상자 조건을 확대하기 위하여 식약처(영양기능연구팀) 문의 및 최근의 식약처 민원설명회와 개별인정형 기능성 원료 인정 관련 개정사항을 토대로 인체적용시험계획서 사전 검토를 추가 실시하였고, 검토결과를 수신하였음.(아래 검토결과 공문 첨부)



국민의 나라 정의로운 대한민국

식품의약품안전처

보건안전



수신 (주)한국생물건강(대표자: 지정근) 귀하 (우04994 서울특별시 광진구 동일로 304 (군자동)) (경유)

제목 건강기능식품 인체적용시험 계획서 사전 검토 결과 알림[GUCCO복합물(감초추출물 +MCT코코넛오일)]

1. 관련 : 영양기능연구팀-5528(2018.12.18.)호

2. 귀사에서 우리 원에 제출한 '건강기능식품 인체적용시험 계획서 사전 검토[원료명 : GUCCO복합물(감초추출물+MCT코코넛오일)]'에 대한 검토 결과는 아래와 같으며, 검토항목 이외의 항목(피험자 안전성)은 검토 제외되었음을 알려드립니다.

3. 참고로, 해당 검토결과는 「건강기능식품에 관한 법률」에 적용받지 않음을 알려드립니다.

순번	항목	검토결과
1	시험디자인	○ 티당
2	대상자 정보	○ 대상자 선정기준에서 '혈중 중성지방 수준 150 mg/dL 이상'에는 환자가 포함될 수 있으므로 환자가 제외될 수 있는 범위(상한치)를 명시 ○ 대상자는 특정집단이 아닌 일반적으로 적용 가능한 범위에서 선정을 고려하여야 함. 대상자에 가능한 한 출연자가 포함되지 않도록 하고, 알코올 섭취 관련 제외기준에 대한 근거 재검토 필요 ○ 시험에 영향을 주지 않도록 의약품 또는 건강기능식품이 충분히 제거될 수 있는 휴약기간(wash-out period)을 고려하여 대상자 제외기준 설정 필요
3	섭취기간 및 측정주기	○ 대조 및 시험물질의 맛, 향 및 성상이 구분되지 않도록 제조 ○ 대조식품은 신장 기능성에 영향을 미치지 않는 물질로 구성되어야 함 ○ 시험식품 구성(500 mg 캡슐에 신장원료 440 mg 함유)이 배합비율(신장원료로서 100%)과 상이하여 검토 필요
4	평가지표	○ 신장 기능성의 추측기전을 설명할 수 있는 기반연구(시험관, 동물시험)와 연관된 평가지표 선정
5	통계처리	○ 인체적용시험에서 '혈중 중성지방 개선' 기능성과 관련한 바이오마커로는 중성지방 수치의 개선이 가장 중요한 평가 지표임 ○ ANCOVA의 설정변수는 보정사유를 명확히 제시하고, 신장 기능성에 영향을 미치지 않는 범위로 설정

식품의약품안전처

주무관 국부혁 연구관 권용만 영양기능연구 전담 2018.1.28. 담당 오광순

참조자

시험 영양기능연구팀-412 (2019. 1. 28.) 관수

우 28159 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187 /www.mfds.go.kr

전화번호 043-719-4430 팩스번호 043-719-4420 / kufjh@korea.kr / 비공개(5,7)

일차리가 성상이고 복지입니다.

CRO 기관(바이오푸드씨알오)과 임상시험 실시기관(인하대병원)과의 협의를 통하여 혈중 중성지방 수치 상한선을 확대하였기에, 이를 통해 임상시험 완료 기한도 앞당길 수 있을 것으로 사료됨.

- 기존) 혈중중성지방 수준 155mg/dL 이상 200mg/dL 미만 ⇒ 변경) 150mg/dL 이상 300mg/dL 미만.

4. 연구결과의 활용 계획 등

본 개발과제를 통하여 획득한 실험 내용과 임상시험 완료 이후 혈중중성지방 개선이 가능한 복합추출물 및 유효성분의 활용이 가능하며, 이를 통해 고부가가치식품산업으로의 육성이 가능할 것으로 기대됨.

한림대학교 산학협력단을 통하여 기술이전을 실시하였고, 이후에 추가적인 협력을 통하여 본 복합추출물을 활용한 제품화에도 적극적으로 활용하고자 함.

최근까지 혈중중성지방 개선 개별인정 신청이 거의 없는 상태에서 기존 글로빈 가수분해물, (식물성 유지)디글리세라이드 함유 유지, 정제 오징어유에 추가로 기능성 원료가 나온다면 의미가 있을 것으로 예상됨.

혈중중성지방 개선 관련 효능 구현 및 실험적인 데이터, 임상시험 데이터를 기반으로 논문 등으로 확보된 연구내용을 토대로 개별인정 준비를 하고, 제품화에 대한 추가 검증도 함으로써 해당 기능성에 대한 시장 진입도 가능할 것으로 사료됨. 현재 보유 중인 코코엘 브랜드를 통해 온 오프라인 마케팅이 가능하도록 준비하고자 함.

붙임. 참고문헌

- 건강기능식품 기능성 평가 가이드 혈중 중성지방 개선에 도움을 줄수 있음 편, 식품의약품안전처, 2016.6
- 「기존 한약서에 대한 잠정규정(보건복지부고시)」에서 정한 한약서
 - 동의보감(東醫寶鑑, 1613), 의학입문(醫學入門, 1575), 수세보원(壽世保元)(17세기초), 경악전서(景岳全書)(1610년), 방약합편(方藥合編)(1884년) 외
- 기능성 원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드(민원인 안내서), 식약처, 2017.6
- 식품안전나라 건강기능식품 원료별 정보(www.foodsafetykorea.go.kr/portal/board)
- 건강기능식품 생산실적, 식약처, 2018.8
- Natural Medicine Comprehensive Database; coconut oil
- JOURNAL OF LIPID AND ATHEROSCLEROSIS, J Lipid Atheroscler, 2013
- Safety Data Sheet Cerin® LCO - SL 5 Mild Coco, Chemrez Technologies
- 건강기능식품 품목제조신고 해설서, 식약처, 2016, 4

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.