

발간등록번호

11-1543000-000774-01

제주 청정지역 경단구슬모자반과 곰솔 추출물로부터
체지방 감소 건강기능식품 개발

Development of functional food on decrease of body fat
from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Pinus
thunbergii* Parl. extract

(재)경기과학기술진흥원

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “제주 청정지역 경단구슬모자반과 곰솔 추출물로부터 체지방 감소 건강기능 식품개발에 관한 연구”의 보고서로 제출합니다.

2015년 2월 3일

주관연구기관명 : (재)경기과학기술진흥원

주관연구책임자 : 안 은 경

협동연구기관명 : (재)제주테크노파크

생물종다양성연구소

협동연구책임자 : 고 미 희

요 약 문

I. 제 목

제주 청정지역 경단구슬모자반과 곰솔 추출물로부터 체지방 감소 건강기능식품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 제주 청정지역에 자생하는 경단구슬모자반과 곰솔 추출물을 이용하여 두 추출물의 지표 물질 설정에 대한 원료표준화 연구를 진행하고 체지방 및 콜레스테롤 감소에 대한 *in vitro* & *in vivo* 기능성 평가를 진행하여 반응기전 연구 및 안전성시험, 기능성 인체적용시험을 통한 체지방 개선 및 완화·예방 기능을 가진 개별인정형 건강기능식품을 개발

III. 연구개발 내용 및 범위

- 경단구슬모자반과 곰솔의 소재 원료 표준화 및 대량 추출 공정 최적화
- 경단구슬모자반과 곰솔 추출물로부터 체지방 감소 기능이 있는 유효물질 규명
- 경단구슬모자반과 곰솔 추출물의 유효성 및 안전성이 확보된 체지방 감소 건강기능식품 소재 개발
 - *in vitro* & *in vivo* 체지방 감소에 관한 기능성 효력 검증
 - 경단구슬모자반과 곰솔 추출물의 안전성 연구
- 표준화된 최적 추출물의 건강기능식품 제품 제형 연구 및 시제품 제작
- 기능성 인체적용시험 및 개별인정신청
- 제품화 및 산업화
 - 제품개발 인프라 및 마케팅 기술 활용을 통한 제품 생산라인 도입 및 제품화 추진

IV. 연구개발결과

- 경단구슬모자반과 곰솔 추출물의 원료 표준화 및 대량 추출공정 최적화
- 경단구슬모자반과 곰솔 추출물의 지표성분 규명 및 주요 유효성분 분리 및 규명
- 경단구슬모자반과 곰솔 추출물의 체지방 감소 유효성 평가 (*in vitro*)
- 경단구슬모자반과 곰솔 추출물의 체지방 감소 유효성 평가 (*in vivo*)
- 경단구슬모자반의 안전성 확보 (단회투여독성시험)
- 시제품 제작 및 인체적용시험 실시

V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 제품화를 위한 연구 성과로 특허 등 지적재산권의 기술이전
- 지역특산물인 제주산 경단구슬모자반 원료의 건강기능식품 개발
- 우도지역에 자생하는 원료의 전량 수급으로 농가의 수입 증대 기대

SUMMARY

(영문요약문)

I. The title

Development of functional food on decrease of body fat from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Pinus thunbergii* Parl. extract

II. The purpose and needs of Research and Development

- In this study, we completed the standardization through setting standard ingredients from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Pinus thunbergii* Parl. extract which are grown naturally of Jeju Clean area. We were also conducted the effects for improving and preventing the body fat by *in vitro* & *in vivo* evaluation system and we confirmed the effectiveness of losing the body weight in clinical trial when they ate the extracts of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt.
- The income of our country will be increase by developing of a high-value products as the raw materials from the domestic agricultural and marine products and this results will be the contribution to the export activity of domestic or global.

III. The contents and scope of Research and Development

- Standardized raw materials and the optimum process of mass extracted production from *Saegassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Pinus thunbergii* Parl.
- Identify the active compounds for decreasing of body fat from *Saegassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Pinus thunbergii* Parl. extract
- Development of candidates can be a functional food which are having the efficacy and safety of *Saegassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Pinus thunbergii* Parl. extract
 - Effect of functional evaluation on reduction of body fat *in vitro* & *in vivo*
 - Safety study from *Saegassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Pinus thunbergii* Parl. extract
- Making the trial manufactured goods from the optimal standardized extract and studying for formulation of raw materials.
- Clinical trials for losing the body weight and apply to MFDS about individual approval
- Commercialization and industrialization
 - Development infrastructure production lines through the marketing technique utilized promotion and commercialization

IV. The results of Research and Development

- Standardized raw materials and the optimum process of mass extracted production from *Saegassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Pinus thunbergii* Parl.
- Identify the active compounds for decreasing of body fat from *Saegassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Pinus thunbergii* Parl. extract
- Effectiveness evaluation for decreasing of body fat from *Saegassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Pinus thunbergii* Parl. extract *in vitro*
- Effectiveness evaluation for decreasing of body fat from *Saegassum muticum* (Yendo) Fensholt and *Pinus thunbergii* Parl. extract *in vivo*
- Confirm the safety effect of *Saegassum muticum* (Yendo) Fensholt (Single oral dose toxicity study)
- Making the trial manufactured goods and clinical trials for losing the body weight

V. Achievements of Research and Development and the applicable planning

- Technology transfer the intellectual property such as patents
- Development of the Functional food based on the active ingredients isolated from *Saegassum muticum* Fensholt extract in Jeju.
- Expectations of increasing the farm income by using the raw materials from growing naturally in region of Udo Island.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Overview of the Research and Development projects	7
Section 1. Needs of the Research and Development	7
Section 2. Objectives and Contents of the Research and Development	13
Chapter 2. Current Technical Developments in domestic and global	14
Section 1. Production and Market Status	14
Section 2. Industrialization trend of Technology Development	23
Section 3. Current Technical Developments in domestic and global	24
Chapter 3. Results and Contents of Research and Development	30
Section 1. Development of Functional Food on decrease of body fat from <i>Sargassum muticum</i> (Yendo)	30
Section 2. Development of Functional food on decrease of body fat from <i>Pinus thunbergii</i> Parl.	135
Chapter 4. Contribution to the Achievements in the related Fields	188
Section 1. Goal and Achievement of Research and Development	188
Section 2. Contribution to the Technical development in the related Field	190
Chapter 5. Achievements of Research and Development and the applicable planning	191
Section 1. Planning for Commercialization and Industrialization (by Technology transfer etc.)	191
Section 2. Planning for Technology Diffusion such as Promotion, education and training	192
Section 3. Planning to Secure Intellectual Property Rights(Patents, Papers, etc.)	193
Section 4. Additional Research and the Applicable Planning of other Research Project	197
Chapter 6. Reference	198

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	7
제 1 절	연구개발의 필요성	7
제 2 절	연구개발의 목표 및 내용	13
제 2 장	국내외 기술개발 현황	14
제 1 절	제품생산 및 시장현황	14
제 2 절	개발기술의 산업화 방향	23
제 3 절	국내외 개발기술 현황	24
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과	30
제 1 절	경단구슬모자반을 이용한 체지방 감소 건강기능식품개발	30
제 2 절	곰솔을 이용한 체지방 감소 건강기능식품개발	135
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	188
제 1 절	연구개발의 목표 및 달성도	188
제 2 절	관련분야의 기술 발전 기여도	190
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획	191
제 1 절	실용화·산업화 계획	191
제 2 절	교육, 지도, 홍보 등 기술확산 계획	192
제 3 절	특허, 논문 등 지식재산권 확보계획	193
제 4 절	추가연구 및 타연구에 활용 계획	197
제 6 장	참고문헌	198

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

○ 비만은 에너지 섭취와 소비의 불균형으로 발생하는 질병으로, 체내에 지방이 과다하게 축적되어 있는 상태를 말하고 그 원인으로는 유전적 소인과 환경인자, 불규칙한 식생활과 스트레스의 가중 등이 있다고 알려져 있음. 또 다른 원인으로는 신경계 내분비 계통의 이상이나 약물, 유전적 원인과 생화학적 이상 반응에 의해서도 초래될 수 있다고 보고되고 있음.

○ 비만이 유발된 경우에는 체내의 물질대사의 이상 뿐 만 아니라 지방조직에 대식세포가 침투하여 염증반응을 일으키고 지방세포 자체가 염증성 사이토카인과 여러 급성기 단백질들의 생산자가 되므로 비만 일 때, TNF- α , Leptin, IL-6, Adiponectin, Resistin 등과 같은 아디포사이트카인들이 증가될 수 있음.

○ 비만은 소아비만을 시작으로 대부분 성인비만까지 이어지고 성인이 된 후에도 발병하는 질병으로 그와 동반되는 합병증으로는 대사증후군이나 동맥경화와 같은 심혈관계 질환, 비알콜성 지방간과 인슐린 저항성 증가에 따른 당뇨병 등을 들 수 있음.

○ 비만치료제로는 장내의 지방분해효소인 lipase의 억제로 섭취한 지방의 소화와 흡수를 억제하는 로슈사의 전문의약품인 ‘제니칼’과 중추신경계에 작용하여 신경말단에서 serotonin과 noradrenaline의 재흡수를 억제하여 포만감을 향진시키고 식욕 조절 작용을 하는 리덕틸이 있었지만, 이러한 약물들은 지속적으로 위장장애, 과민증, 담즙분비장애, 지용성 비타민 흡수억제, 구토, 변비 등의 부작용이 계속 보고되고 가장 큰 부작용으로 심장마비나 뇌졸중 위험도가 증가함에 따라 현재는 판매가 중지되었음. 또한 프랑스에서 개발된 일반의약품으로 녹차의 카테콜 성분을 주원료로 하는 체중감소 보조제인 ‘엑소리제’ 등도 있으나, 아직 그 안전성이 불완전한 상태이고, 이 치료제 역시 해외 개발신약이므로 국내의 비만 치료제 및 보조제에 대한 독자적인 기술 확보로 이어지는 제품을 생산하는 시장형성에는 도움을 주지 못하고 있음.

○ 따라서 국내 기술로 안전성이 확보된 천연물을 이용하여 새로운 기전을 가진 부작용이 적은 비만 치료제 개발이 시급하나, 이 결과는 짧은 시간에 이루어지는 것이 아니므로 그에 앞서 비만치료 및 보조 역할을 할 수 있는 기능성 식품 개발이 우선적으로 이루어져야 함. 이후 이를 기반으로 안전성이 확보된 기능성 식품이 제품화되면 지속적으로 그 효력에 대한 연구를 진행하여 최종적으로 우리나라 최초의 비만관련 천연물 신약이 개발될 수 있을 것이라고 생각함.

2. 사회적 측면

○ 세계보건기구(WHO)에 의하면 현재 지구상에 약 10억 인구가 과체중이며, 그 중 3억 인구가 비만환자로 분류되어 있음. 한국의 경우 20세 이상 남녀의 비만 유병율은 1998년 26.3%였으나 2025년에는 31.5%로 증가될 것으로 예측했음. (한국질병관리본부, 2008). 또한 세계적으로

소아비만의 증가가 10년을 주기로 3배 이상 급증하고 있어 미래에는 더 많은 성인 비만인구의 증가를 초래할 것으로 예상된다.

○ 비만인구의 증가는 비만 합병증인 당뇨, 동맥경화, 심혈관계 질환, 고혈압, 고지혈증 등과 같은 성인병 환자를 증가시킴에 따라 대사질환 유병률도 같이 증가시키고 대장암, 직장암, 전립선암, 유방암, 난소암 등 각종 암 환자의 발생빈도도 높이고 있음. 이로 인한 사회경제적 손실이 커지고 있으며, 손실액은 진료비와 치료비, 그와 관련된 간접비용까지 총 2조 1천억 원으로 추정됨. 이러한 이유로 비만의 예방 및 치료에 대한 사람들의 관심은 더욱 증가되고 있으며, 이로 인해 형성될 항비만 기능성 식품시장과 제약시장 또한 더욱 크게 형성할 것으로 전망함.

3. 산업, 경제적 측면

○ 현재의 비만 관련 치료제는 대부분 제약 산업에 의존해 옴. 실제로 국내 비만치료제 수요 동향을 살펴보면, 국내에서 비만치료제로 시판허가를 받은 의약품 시장은 2005년 609억 원에서 2007년 760억 원으로 2년 동안 25%가 확대되었고 2008년에는 800억 원에 도달했음.

○ 현재 국내에서 과체중과 비만으로 소비되는 비용은 여성의 경우 1년에 1조 2,313억 원, 남성은 9,305억 원으로 2조 원대를 넘어서고 있음. 전체 비만 시장이 1조원으로 추정되고 있으나 처방 비만치료제 시장은 1,000억 정도에 불과하고 나머지 9,000억 시장은 한약 체형관리 시장이 자리 잡고 있음.

○ 국내의 건강기능성식품시장은 “2013 식품의약품 통계연보” 결과에 따르면 2010년도 건강기능식품 국내 판매액은 1,021억 원, 2011년 1,312억 원, 2012년 1,350억 원으로 매년 증가되는 추세를 보이고 있음. 건강기능성식품중 판매 1위를 차지하고 있는 식품은 홍삼제품으로 판매액은 2012년도에 648억 원의 매출액을 올렸으며, 이 판매액은 전체 건강기능성식품 판매액의 약 50% 정도를 차지하는 액수로 매우 높은 비중을 나타냄. 홍삼 관련 제품들은 인체의 면역과 생리기능을 강화해주고 보호해 주는 기능을 지닌 건강기능성식품이고 현재 다른 질병을 치료하거나 보호해 주는 기능을 가진 식품들의 판매 및 매출액의 비중은 매우 낮은 상태임. 따라서 다른 질병의 치료 또는 치료보조제 기능을 가진 건강기능식품의 개발과 제품화는 매우 시급하며 그 중 만병의 원인이 될 수 있고 비만환자들이 급증하는 현재, 기능성 식품 선호도 조사 1위를 차지하는 비만 치료와 관련된 기능성식품의 개발과 제품화 출시를 위한 연구는 빠르게 진행되어야 함.

○ 그러므로 이번 연구를 통해 매년 증가하고 있는 전체 항비만 시장에서 기능성과 안전성이 확보된 경단구슬모자반 추출물을 이용하여 비만 억제 작용기전이 입증된 제품이 출시된다면, 모든 비만 치료제 중 가장 우려가 컸던 부작용 문제가 해소되고 국내 생산을 통해 가격경쟁력 면에서도 기존의 높은 가격대의 다국적 외국계 기업의 비만치료제 및 비만개선 기능식품들을 앞설 수 있을 것임. 또한 국가와 연구소, 산업체의 연구협력을 통한 제품개발의 결과로, 국내 생산 원료와 국내기술 개발에 의해 로열티 지급이 없는 저가격 형성을 이룰 수 있으므로 가격

경쟁력을 확보함으로써, 향후 기능성 식품 시장에서 경제적으로 큰 부가가치를 창출할 수 있는 제품이 될 것으로 사료됨.

○ 또한 이러한 시장에 효능이 과학적으로 입증된 항비만 기능성식품이 제품으로 보급된다면 원료를 납품하는 농가들의 소득 증가에 기여함과 동시에 국내외의 시판으로 이루어진 경제활동도 가능하게 되며, 궁극적으로는 기능성 식품개발에 의한 제품화 과정이 산·학·연으로 이루어진 연구개발의 성과이므로 국가가 추구하는 연구개발 형태의 본래 취지에도 부합하게 되어, 이러한 개발이 연구사례로 남아 후속 연구로 진행되는 다른 질병 치료제나 치료보조제 역할의 기능성 식품 개발에도 큰 도움이 될 것으로 전망됨.

가. 체지방 감소 관련 원료 및 기능성 인정 현황

○ 체지방 감소 기능성과 관련하여 그 기능성을 인정받은 원료로는 지방세포의 연소를 촉진하는 기능을 가진 식물성 성분인 soy peptide와 신속한 지방분해 기능이 있는 L-카르니틴과 지방합성을 억제하는 가르시아 캄보지아(HAC) 등이 있음.

○ 2013년 식약처 건강기능식품의 기능성원료 인정현황에 따르면 현재 체지방 감소 기능성으로 14가지 정도의 원료들이 그 기능성을 인정받은 상태임. 체지방 감소에 도움이 되는 원료 이외에 비만과 관련된 기능성으로 다수의 원료들이 개별인정형으로 인정을 받은 상태임. 원료 및 성분 인정 현황을 살펴보면, 혈중 콜레스테롤 개선에 도움으로 12건, 혈당상승 억제 도움으로 17건, 혈중 중성지방에 도움으로 7건, 혈행개선에 도움으로 7건이 있음.

<표 1-1. 기능성 원료 중 비만 관련 질환 원료 또는 성분 인정 현황>

번호	기능성 항목		기능성 원료	건수
1	체지방	체지방 감소에 도움	가르시나아캄보지아껍질추출물, 공액리놀레산(유리지방산), 공액리놀레산(트리글리세라이드), 그린마떼추출물, 녹차추출물, 대두배아추출물등복합물, 레몬밤추출물혼합분말, 중쇄지방산함유유지, 콜레우스포스콜라추출물, 히비스커스등복합추출물, 깻잎추출물, L-가르니틴 타르트레이트, 식물성유지 디글리세라이드, 키토올리고당	14
2	콜레스테롤	혈중 콜레스테롤 개선에 도움	대나무잎추출물, 보리 베타글루칸추출물, 보이차추출물, 사탕수수 왁스알코올, 스피루리나, 식물스타놀에스테르, 아미인, 알로에추출물, 알로에복합추출물, 창년양파추출액, 홍국쌀, 씨폴리놀 감태주정추출물	12
3	혈당조절	식후 혈당상승 억제에 도움	구아바잎추출물, 난소화성말토덱스트린, 동결건조누에분말, 마주정추출물, 바나바추출물, 솔잎 증류농축액, 알부민, 인삼가수분해농축액, 지각상엽추출혼합물, 쥐눈이콩펩타이드복합물,	17

			콩발효추출물, 타가토스, <u>탈지달맞꽃종자추출물</u> , 피니톨, 홍경천등복합추출물, nopal추출물, 실크단백질효소가수분해물	
4	혈중중성지방	혈중중성지방 개선에 도움	글로빈가수분해물, 난소화성말토덱스트린, 대나무잎추출물, 식물성유지디글리세라이드, 정제오징어유, 정어리정제어유, DHA 농축유지	7
5	혈행개선	혈행개선에 도움	나토배양물, 은행잎추출물, 정어리정제어유, 정제오징어유, 프랑스해안송껍질 추출물, 홍삼농축액, DHA 농축유지	7

(_____: 고시형 원료로 진화된 기능성 원료)

(출처: 식품의약품안전처, '건강기능식품의 기능성원료 인정현황 (2013)')

나. 비만 치료 보조제 및 예방 기능성 식품의 우수 연구사례

○ 비만 치료제들을 제외하고 항비만 기능성 성분을 함유한 제품을 만들기 위하여 기존에 판매되고 있는 기능성 식품들의 특징을 파악한 결과, 그 중 가장 많은 신뢰성과 시장성을 확보한 CJ사의 팻다운을 들 수 있음.

○ 팻다운은 지방세포의 연소를 촉진하는 기능이 있는 식물성 성분인 soy peptide로 신속한 지방분해 기능이 있는 L-카르니틴과 지방합성을 억제하는 가르시아 캄보지아(HAC) 성분이 들어 있어 지방분해, 지방생성억제 및 근육강화 기능을 한다고 알려져 있고, 이는 단독 섭취 시보다 운동과 함께 병용 섭취를 한 경우 효과를 배로 볼 수 있다고 알려져 있음. 이 제품 전에 같은 회사에서 출시된 뷰랩이라는 다이어트 식품은 맛의 풍미가 떨어지고 소비자들의 기호도면에서 부족하여 외면을 받아 시판이 중단되었음. 팻다운은 비만 억제 보조 식품으로 제약으로 분류되어 판매중인 약물들과 비교해보면 복용량과 시기가 다양하며 부작용이 적은 반면 그 효능은 많이 떨어지는 것으로 확인됨. 이는 그 효능보다 그 제품을 출시하는 회사의 여러 가지 소비자 마케팅의 전략으로 기능성 식품 시장에서 자리 잡고 있다고 할 수 있음. 또한 팻다운의 경우는 운동과 함께 병행해야 효과를 볼 수 있으므로 운동량이 부족한 현대인들에게는 큰 효능을 기대하기 어려운 것이 단점으로 지적됨. 따라서 그 기능성 식품의 본질적인 비만억제 효과를 바탕으로 이루어진 판매실적이라기보다는 대기업의 마케팅에 의한 여러 가지 상업적인 포장으로 만들어진 시장점유율이므로, 비만을 직접적으로 억제하는 기능을 가지는 항비만 건강 기능성 식품의 연구와 제품화에 따른 상용화는 무엇보다도 절실히 요구됨.

4. 경단구슬모자반의 국내의 사용현황 및 인정현황

가. 국내의 사용현황

○ 한약재명은 해조(海藻), 생약명은 Sargassum으로 *Sargassum fusiforme* (Harv.) Setch 또는 기타 동속 근연식물(해마조과 Sargassaceae)의 전초임. 중국의 '중화본초'라는 고서적에서는 경단구슬모자반을 한약재로 사용하였다는 기록이 있음. 현재 사용 중인 것은 향장품으로 *Sargassum muticum* extract라는 성분명으로 피부컨디셔닝제의 원료로 등록되어있음. 예전부

터 먹어오던 음식이나 모든 분야에서 연구가 미비하므로 제품 개발 시 고부가가치 창출 효과가 클 것으로 예상됨.

나. 국내의 인정현황

(1) 몸은 뿌리, 줄기, 잎의 구분이 뚜렷하고, 짙은 황갈색을 띄면서 나물로 먹거나 알긴산 등의 원료로 쓰임. 조간대 하부에서 자라는 것으로 흔히 모자반과에 속하는 대형 갈조류를 통칭하는 말로도 쓰이며, 짙은 황갈색을 하고 한국의 전 해안에서 볼 수 있고 식용으로 이용되는 모자반류의 대표적인 종류로 흔히 시장에서 팔고 있음. 모자반속(Sargassum)은 난해성(暖海性) 식물로서 여러해살이이며 한국의 연안에서 해중림(海中林)을 이루는 대표적인 종류이며 지충이·팽생이모자반·알송이모자반·파배기모자반·큰잎모자반·작잎모자반·쌍발이모자반·경단구슬모자반 등 약 20종이 채집되고 모자반은 식품공전 원재료부분에 조류로 분류되어 식용가능하나 식용 근거는 없고 공전에 등재 되어있지 않은 상태임.

<식품원재료 검색 데이터베이스 검색>

(출처 식품의약품안전처 <http://fse.foodnara.go.kr/origin>)

○ 모자반

식품의약품안전처 식품원재료
SEARCH ENGINE 2004
관련사이트 | 문의사항

• 식품 원재료명 검색

※ 자료는 구축중인 자료로 완성된 자료가 아니므로 **식용가능여부 판단을 위해서는 반드시 식품의약품안전처로** 질의하여 주시기 부탁드립니다.

통합검색 | 상세검색 | 식물 | 동물 | 미생물 | 수산물

매립구분 : 전체 | 식용여부 : 전체
원재료 분류 : 전체 | 공전등재여부 : 전체 | Sargassum fulvellum [검색]

원재료	이명	학명	생약명	식용가능여부		
				가능	제한적	불가능
모자반 (Gulf weed, Sea-jentil)	Hondawara(일명)	Sargassum fulvellum		○		

※ 식용여부가 공란인 원료(부위)를 식용으로 사용하기 위해서는 사전 검토가 필요함을 알려드립니다.
※ 원재료명을 클릭하면 상세정보를 보실 수 있습니다.

○ 경단구슬모자반

식품의약품안전처 식품원재료
SEARCH ENGINE 2004
관련사이트 | 문의사항

• 식품 원재료명 검색

※ 자료는 구축중인 자료로 완성된 자료가 아니므로 **식용가능여부 판단을 위해서는 반드시 식품의약품안전처로** 질의하여 주시기 부탁드립니다.

통합검색 | 상세검색 | 식물 | 동물 | 미생물 | 수산물

매립구분 : 전체 | 식용여부 : 전체
원재료 분류 : 전체 | 공전등재여부 : 전체 | Sargassum muticum [검색]

원재료	이명	학명	생약명	식용가능여부		
				가능	제한적	불가능
검색된 내용이 존재하지 않습니다						

※ 식용여부가 공란인 원료(부위)를 식용으로 사용하기 위해서는 사전 검토가 필요함을 알려드립니다.
※ 원재료명을 클릭하면 상세정보를 보실 수 있습니다.

(2) 국내 : 경단구슬모자반은 식품의약품안전처에 식품원료사용으로 미등록 되어 있으나 <모자반 (Sargassum fulvellum)>은 식품원료로 등록되어있음. 그러나 경단구슬모자반은 모자반중에

속하는 해양식물로 이미 제주지방에서는 몸국 또는 몸지의 원료로 사용되어 오랜 전부터 현재 까지 지역을 대표하는 음식으로 섭취해오고 있음.

(3) 국외 : 식품원료사용 미등록

(4) 식용 가능 향토자료

(가) 몸 또는 물망은 모자반의 제주방언임. 몸국(모자반국)은 대개 집안의 대소사를 치르기 위하여 돼지를 잡았을 때 만드는 국으로 몸(모자반)과 녹물(나물), 늪배(무우) 등의 채소를 넣음.

- 제주인의 지혜와 맛 전통향토음식. 고양숙. 2012. 성민출판사. 161p.

(나) 몸지(모자반장아찌)는 멸치젓에 담그기도 하는데 모자반의 수확철인 겨울에 발효된 멸치 젓국을 모자반에 부어 향아리에 꼭꼭 눌러 담고 멧돌로 눌러 두었다가 새봄에 꺼내 먹으면 입맛을 돋우는 밑반찬임.

- 제주인의 지혜와 맛 전통향토음식. 고양숙. 2012. 성민출판사. 320p.

(다) 신부집에서 결혼식 전날 친척들에게 대접하는 가문 잔치상에 돼지고기 썰다 남은 고기 부스러기, 돼지창자, 굵은소금, 보리쌀에 약간의 곤 쌀과 팔을 넣고 초불밥과 고기, 순대를 삶고 난 국물에 몸을 넣고 푹 끓인 몸국을 냄.

- 제주도 음식문화. 김지순. 2001. 도서출판 제주문화. 88p.

(라) 제주 사람들은 생식을 많이 하는 편이어서 어류도 싱싱한 채로 먹는 경우가 많음. 생선을 날로 먹는 물회나 강회, 냉국 등의 음식이 발달되어 있으며 종류 또한 매우 다양함. 툇이나 모자반 등의 싱싱한 해산물도 냉국의 재료로 많이 쓰임.

자리젓, 멧젓, 개웃젓(전복 내장으로 만든 것) 등과 건미역, 툇말림(툇말림), 몸말림(모자반말림), 무말랭이 등은 제주특유의 저장식품임.

- 제주도 음식문화. 김지순. 2001. 도서출판 제주문화. 70p.

(마) 몸국은 잔칫집에서는 잔치 전날, 초상집에서는 일뿏날 돼지를 잡아 삶아 낸 물에 모자반, 배추, 메밀가루, 돼지내장을 넣고 가마솥에서 끓여 그날 온 손님에게 대접했던 음식임. ‘물망국’이라고 부르기도 하며 식성에 맞게 썬 김치나 고춧가루, 후춧가루 등을 넣어 먹는데, 이 국은 뜨거울 때 먹는 것이 맛이 좋음.

- 한국의 전통향토음식10 제주도. 김행란. 2008. 교문사. 94p.

(바) 메밀가루 반죽에 모자반, 신김치, 양념한 돼지고기를 넣고 둥글게 펴서 지져서 몸전을 만들어 먹음.

- 한국의 전통향토음식10 제주도. 김행란. 2008. 교문사. 174p.

(사) 몸은 거름으로 쓰이는 거친 ‘물망’종류와 식용으로 하는 비교적 부드러운 ‘츄몸’이 있음. 먹는 방법은 간장에 담가뒀다 꺼내 먹는 ‘몸치’와 파나 무를 썰어 무쳐 먹는 ‘몸자반’, 그리고 국을 끓이는 ‘몸국’이 있음.

- 탐라의 맛 한샘 - 제주도의 향토음식. 김창집. 1993. 55p.

제 2 절 연구개발의 목표 및 내용

1. 연구개발의 목표

가. 연구개발의 최종 목표

본 연구에서는 제주 청정지역에 자생하는 경단구슬모자반과 곰솔 추출물을 이용하여 두 추출물의 지표물질 설정에 따른 원료표준화 연구를 진행하고 체지방 감소에 대한 *in vitro* & *in vivo* 기능성 평가를 진행하여 반응기전 연구, 안전성시험, 기능성 인체적용시험을 통한 체지방 감소 및 완화·예방 기능을 가진 개별인정형 건강기능식품을 개발함으로써, 국내 농수산물을 원료로 하는 고부가가치 상품 창출로 국내외 수출 활성화 및 농가의 소득 증대에 기여하는 것을 최종목표로 함.

연구개발의 목표



2. 연구개발의 내용

- 원료 수급 및 대량 추출 공정법 확립
- 원료 표준화 및 지표 유효성분 분리
- 체지방 감소 기능에 관한 효력시험 및 작용기전 연구 (*in vitro*)
- 동물내 안전한 농도 설정 및 체지방 감소 기능에 관한 효력 시험 (*in vivo*)
- 안전성 연구
- 제형 연구 및 인체적용시험
- 특허 등록 및 개별인정 획득을 통한 제품화

3. 연구개발 내용 및 기관 역할



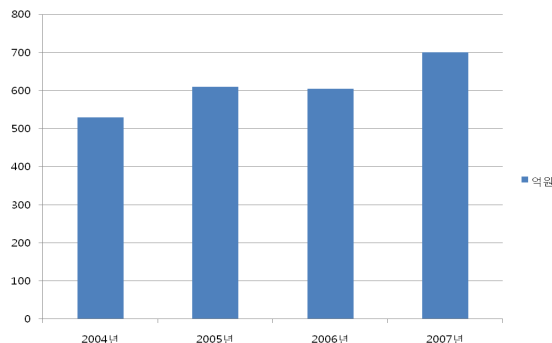
제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 제품생산 및 시장현황

1. 국내 제품생산 및 시장현황

○ 현대사회는 도시화와 산업화, 환경적 변화로 인해 과잉된 영양 섭취와 정보통신의 발달로 육체적인 활동이 감소되고 유전적, 정신적 요인에 의해 신체의 밸런스가 깨져 비만이 발생하고 있음. 그래서 비만은 전 세계적으로 심각한 질환으로 대두되고 있음. 2005년에 국민영양건강에서 조사한 바에 의하면, 20세 이상 성인 비만 인구는 31.8%이고, 남자는 32.5%, 여자는 28.3%로 나타났고, 현재 우리나라 비만인구는 1천 500만 명에 달하고 있음. 또한 비만 인구가 계속 증가되는 추세이므로 2025년에는 전 세계 인구의 3분의 1이 비만환자가 될 것이고, 우리나라의 경우 2명 중 한명 꼴이 비만 환자가 될 것이라고 함. 최근 세계보건기구 (WHO)에서는 비만을 ‘전 지구적 전염병’으로 선언하고 개인이 아닌 국가적 차원에서 접근해야할 것을 권고하고 있으며 이미 OECD 가입국들은 OECD 국민의료비 통계로 비만과 과체중의 인구 비율을 조사하여 예방에 힘쓰고 있음.

○ 식품의약품안전처의 승인을 받아 국내에서 지금까지 시판되었던 비만치료전문의약품은 리덕틸과 제니칼을 포함해 6종이 있음. 그러나 현재 리덕틸은 국내 판매 중지 상황이고 IMS 데이터 보고에 따르면 비만치료전문의약품 중 제니칼 매출액은 2011년에 75억 원의 매출액을 기록했고 이것은 전년 매출액인 90억 원 보다 16.6% 감소한 수치임. 제니칼은 89억 원의 매출액을 가진 항정약 ‘푸링(펜디메트라진, 드림파나)에 이어 2위를 차지하였음. 하지만 펜디메트라진 항정 비만약은 단기 처방밖에 할 수 없다는 단점이 있음. 또한 세계 2012년 판매액 1위를 기록한 아레나사의 로카세린(제품명 벨비크)은 국내 일동제약과 판권계약을 맺고 출시 계획 중임 (출처 데일리메디). 일반의약품으로 ‘엑소리제’ 등 15종이 있는데 이 제품은 녹차 추출물을 주 성분으로 해서 만들어진 의약품으로 기능성 식품으로 쓰이는 미국과는 달리 우리나라에서는 비만 보조 치료제로 알려져 주목을 받고 있는 제품임. 국내 비만 치료제 시장은 점점 확대될 것으로 예상됨. <그림 2-1>



<그림 2-1. 국내 비만 치료제 시장 규모 (단위: 억원) >

(출처 : IMS 헬스 코리아)

○ 국내에서 비만치료제 개발은 신약을 개발하기보다는 개발비가 적게 드는 제네릭 의약품에 주력할 수밖에 없는 실정임. 우리나라는 리덕틸의 개량신약인 리노반을 출시했고 이것은 기존 리덕틸과 거의 같은 효능을 갖고 있음. 현재 우리나라는 아직 초보단계이긴 하지만 정부와 제약업계간에 힘을 합쳐 신약 개발에 앞장서고 있음. 하지만 제약사의 약값 인하와 한미 FTA 협정을 통한 오리지널 제약사사와의 지적재산권 분쟁 가능성이 있는 상황에서 연구 개발이 어려움이 한층 가중되고 있음(열린마루, 2012년 9월호). **최근 국내에서는 합성물의 부작용을 우려해 선진국들의 비만 치료제 개발과는 달리 생명공학기술을 이용해 부작용을 최소화 할 수 있는 천연물 기반 비만 치료제 개발에 관심이 집중되고 있음.** 또한, 국내에서는 이런 비만 치료제 개발에만 국한하지 않고 비만 클리닉이나 병원 내 비만센터 등을 통해 비만을 집중적으로 관리 치료해 주는 프로그램들이 생겨나고 있음. 이런 비만에 대한 관심은 비만 치료제 및 보조제 개발로 이어지고 더 나아가 비만 치료를 위한 의료기기나 기능성식품 개발에도 영향을 주고 있음. 이런 관심의 영향으로 수요 급등을 염두에 두고 현재 기업들은 식품 및 음료 시장으로 영역을 확대하고 있음.

○ 70-80년대는 대량생산과 대량판매로 식품산업 성장률을 10 %대를 달성하였고, 주로 장치산업중심 투자이며 생산자 중심이었으나. 90년 초에는 공급이 수요를 초과하여 식품산업이 성장기에서 후기 성장기로 접어들며 가공식품을 만들기 시작하였음. 국민소득 10,000 달러에 가까워지면서 보다 신선한 식품과 건강, 환경, 안전을 생각하는 고기능성 프리미엄 상품을 출시하기 시작하였음. 건강기능성식품의 유통구조 다각화, 시장진입 업체의 다양화, 구매력 높은 노령 인구 증가, 경기 회복에 따른 소비심리 회복으로 대중화와 시장을 확대시킨 결과 국내건강기능식품 시장은 1990년대 중반 건강보조식품에서 출발하여 건강기능식품 생산액은 연평균 9%로 늘어났고 수입액은 가장 큰 비중을 차지하는 영양보충제의 수입 감소로 2006년 이후 크게 감소하다가 2007년부터 해마다 급속히 늘어났음. 또한 식약처는 2011년 건강기능식품 생산 실적을 분석한 결과 총 생산액은 1조3천682억 원으로 2010년 대비 (1조671억 원) 28.2% 증가했으며, 이는 건강기능식품 연평균 성장률인 27.4%와 비슷한 수준인 것으로 나타났음. <표 2-1, 그림 2-2>.

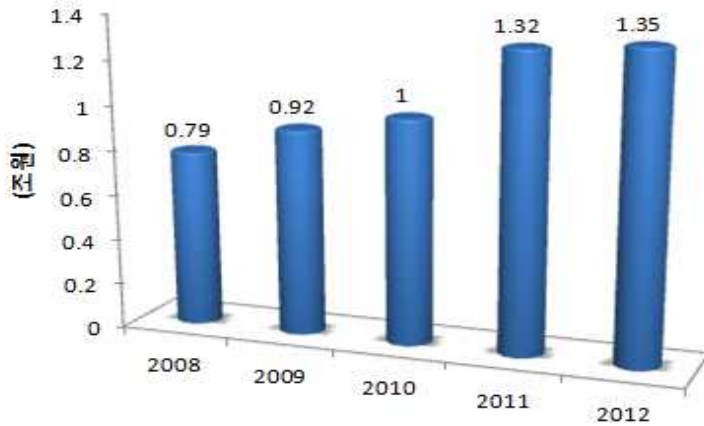
<표 2-1. 연도별 건강기능식품 생산 현황 (2004~2011)>

(단위: 억원, 톤)

구 분	총 생산액	총 생산량	내수용		수출용	
			생산액	생산량	생산액	생산량
2004	2,506	4,764	2,263	4,250	242	514
2007	7,235	10,578	6,888	10,239	346	339
2008	8,031	13,687	7,516	12,990	514	697
2009	9,598	19,885	9,184	19,293	415	592

2010	10,671	25,361	10,211	24,994	460	367
2011	13,682	40,258	13,126	39,611	556 ¹⁾	647
비율(%) (‘11/‘10)	28.2	58.7	28.5	58.5	21.0	76.3

(출처: ‘11년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표자료 식품의약품안전처, 2012)



<그림 2-2. 건강기능식품 시장규모>

(출처 : 2013 식품의약품통계연보)

○ 건강기능식품 중 소비자들이 가장 선호하는 품목으로 단연 1위는 홍삼 제품이고 글루코사민, 허브, 칼슘, 비타민 등으로 나타났으며 이들 소재를 활용한 시장의 지속적인 성장이 예상되며 개별인정형 건강기능식품의 확대에 따른 소재의 다양화와 구미에 맞는 제품을 골라 구매할 수 있는 선택의 폭이 넓어진 반면 그동안 시장참여를 관망하던 거대한 식품대기업들의 건강기능식품 시장에 본격 진출로 인해 전체 시장 규모도 20% 이상 성장할 것으로 예상됨. 건강기능성식품 시장 규모의 증가에 힘입어 건강기능성식품 국내 판매액 및 수출액은 2011년도 각각 1,312억 원과 45억 원이고 2012년에는 각각 1,350억 원과 58억으로 총 매출액이 2011년은 1,368억 원 2012년은 1,409억 원 연도별 10% 이상 성장률을 보이고 있음 <표 2-2>.

<표 2-2. 건강기능식품 매출액, 국내 판매액 및 수출액>

구분	소계 (억원)	국내판매액 (억원)	수출액	
			달러(\$)	억원
2010	1,067	1,021	36,763,965	45
2011	1,368	1,312	50,207,582	55
2012	1,409	1,350	51,893,120	58

(출처 : 2013 식품의약품통계연보)

○ 비만은 생활습관의 교정으로 1차적으로 완화될 수는 있으나 약물치료가 불가피한 경우도 있음. 이에 따라 장기간 약물치료의 부작용을 줄이고 다양한 증상을 효과적으로 치료하는 새로

운 치료 전략이 요구되는 상황이므로 현재 간질환, 동맥경화, 고혈압, 당뇨병, 노화 및 골다공증 예방식품, 비만방지 다이어트 식품 등 여러 종류의 기능성 식품용 소재가 활발히 탐색되고 있으며 산업화 되고 있음. 현재 연구 중인 건강기능식품 분야를 살펴보면 비만과 관련된 분야로 비만조절, 당뇨조절, 혈전, 콜레스테롤저하, 등이 많은 부분을 차지하고 있음 <그림 2-3>.



<그림 2-3. 개별인정 및 현재 연구 중인 건강기능식품 분야>

(출처: 바이오푸드네트워크사업단, 국내 바이오식품 산업의 수요도조사)

○ 현재 주목받고 있는 기능성 식품 소재로는 표 4에 나타내었고, 그 중에 비만과 관련된 기능성 소재로는 식물 유래의 폴리코사놀 (옥타코사놀), 플라보노이드, 대두올리고당, 이소플라본, 피니톨 등이 있고 미생물 유래의 기능성 물질인 GABA, 모나콜린-K 등이 있음. 또한 서울대 생명과학부의 국내 연구팀이 일부 자생 약용식물에 함유된 비만, 당뇨 억제물질인 '베르베린 (berberine)'이 항비만 및 항당뇨 효과를 가지고 있다고 밝혔으며 이 성분은 한국과 중국 등의 동양의학에서 향균과 설사 감염 등의 치료에 효과가 있는 것으로 알려져 있음. 기능성 식품으로는 가장 판매가 우수한 제품으로는 CJ 제일제당에서 만든 팻다운과 디팻으로 배변활동을 원활하게 하고 체중감량과 체지방 분해, 지방흡수와 합성을 저해시키는 효과가 있고 풀무원 건강 생활에서 개발한 이브감마리놀렌산 300과 뉴트리바이오텍의 오메가3은 콜레스테롤과 혈행 및 혈중 중성지방 개선에 효과가 있으며 다이어트 소재의 인기가 계속됨에 따라 대웅제약의 CLA 플러스는 체지방을 감소시키는 개별인정형 제품으로 알려져 있음. 또한 혈당유지에 도움을 주는 광동파인맥스 골드와 혈압 저하와 항산화 효과가 있는 티코텐 등이 있음 <표 2-4>.

<표 2-3. 주목받고 있는 기능성식품 소재>

구분	소재	기능성
항산화 식품 소재	비타민 C, D, E, 베타-카로틴, 플라보노이드류, 바닐린, 쿠르쿠민, 마늘류, 셀레늄, 아연	항암성, 항산화성, 면역기능 증강, 콜레스테롤 저하

항암성 소재	플라보노이드류, 쿠마린, 트리테르펜, 페놀산, 카로티노이드, 모노테르펜, 올레노익산, 진저롤, 모노락톤, 퀴논환원제	항암성, 발암촉진인자 활성화억제와 종양세포 생성방해 작용
순환기 질환 예방식품	메밀, 아스파라거스, 매실, 키위, 파인애플, 대합, 오징어, 포도주, 석류, 대두발효식품, 오메가3 지방산	엔지오펜신전환효소(ACE)저해, 혈압 강하, 중성지방 감소, 혈전증 저하
장내총균 조절식품	락툴로즈, 프락토올리고당, 파노즈 등 각종 당류	장내유용세균 증식, 장내총균 개선효과
당뇨 조절식품	보리, 두류, 식이섬유, 페놀화합물, 효소저해제 등	혈당반응 감소

(출처: 한약재를 이용한 기능성식품의 개발 동향, 한국과학기술정보연구원(2003))

<표 2-4. 국내 비만 및 그와 관련 기능성식품 품목>

품명	성분	기능	업체명
팻다운, 디팻	가르시니아 캄보니아 껍질 추출물인 HCA	체중감량에 도움 지방흡수 저하 지방합성 저해 체지방 분해	CJ 제일제당
뉴트리키즈 푸로틴(베리) 대두단백질	대두단백질	높은 혈중 콜레스테롤 수치의 개선에 도움	한국 암웨이
애플리헬스 쓰리비 하모니	오메가3 지방산 코엔자임Q10 바나나주정추출물	오메가3 : 혈행개선 혈중 중성지방 개선 코엔자임Q10 : 항산화, 고혈압에 도움 바나나주정추출물: 혈당 조절	(유)한풍제약
이브감마리 놀렌산 300	감마리놀렌산	콜레스테롤 개선 혈행개선	플무원건강생활(주)
광동파인맥 스골드		건강한 혈당유지에 도움	광동제약(주)
보령 슈퍼오메가3	오메가-3지방산 비타민E	혈중 중성지방 개선 혈행 개선	(주)뉴트리바이오텍
티코텐(T-C o10)	코엔자임Q10 비타민E	항산화, 고혈압에 도움	(주)렉스진바이오텍
다이어트 CLA플러스		지방축적억제 개별인정형	(주)대웅제약

(출처: 지식경제부 지역연교육성사업 바이오푸드네트워크, 2011
식품의약품안전청(KFDA) 건강기능식품정보, 2011)

○ 천연물을 이용한 건강기능식품으로 인삼류 제품이나 알로에 관련 제품, 스쿠알렌 등 단일 품목 중심의 시장이 형성되어 있지만, 천연 추출물의 제형화 방식을 선택하거나 제품의 다양화, 건강기능성 관련 기술의 다양화는 아직 이루어지지 못하고 있는 실정임. 천연물은 생리적, 약리적 유효성을 근간으로 하여 식품, 의약품, 화장품 등의 분야에서 고부가가치 상품의 기능적 소재로 활용할 수 있는 무한한 가능성을 지니고 있고 잠재성 높은 기능성 소재가 풍부하며 건기법 시행에 따른 소비자 신뢰향상 및 의사 등 전문가 참여에 의한 시장 확대로 실제 많은 제약회사나 바이오 벤처 기업들이 천연물을 이용한 신약을 개발하고 있으며, 그 전단계로 한약재에서 유효성분을 추출하여 기능성 식품이나 화장품으로 개발하여 상품화하고 있음. 그리하여 기능성 식품의 개발은 최첨단의 생명공학기술을 이용하여 부가가치의 창출과 그 기능성을 극대화 하려는 방향으로 진행되어야 하며 국내외 논문에 발표된 천연물 소재들을 대상으로 약효와 안전성시험 등을 실시하여 의약품의 원료나 기능성 식품의 소재로 개발해야 함.

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 최근 비만 인구 증가와 더불어 혈압이나 혈당, 혈중 콜레스테롤 수치가 높거나 중성지방이 많아 생기는 대사증후군 환자 수가 매년 급증하고 있음. 특히 고령화 사회로 접어드는 현 시점에서 이런 대사증후군 개선을 위한 치료제나 건강보조식품 시장은 매년 급속히 성장하고 있으며 그와 관련된 제품 시장의 경쟁도 나날이 치열해 지고 있음.

○ 미국 및 전 세계의 비만 관련 시장은 매년 급속히 성장하고 있으며 비만 치료제 및 그와 관련된 제품 시장의 경쟁도 나날이 치열해 지고 있음. 이를 반영하듯 미국의 많은 제약업체들은 차세대 비만치료제를 개발하기 위해 지속적인 연구지원과 투자를 많이 하고 있음. 미국을 포함한 유럽 국가와 일본 등의 비만 치료제 매출 규모는 2006년 4억 7,800만 달러였고 10년 후인 2016년에 27억 달러에 달할 것으로 예측했음. 또한 디시전리틸스는 2016년 비만 치료제 시장은 비만 환자 비율이 가장 높은 미국이 현재에 비해 약 10배 가까운 20억 달러 수준까지 성장할 것이라고 예상함. 지금까지 가장 널리 쓰이는 비만 치료제로는 제니칼(로슈), 리덕틸(애보트)이 있으며, 이 비만 치료제는 세계 시장규모의 대부분을 차지하며 비만치료제 시장을 거의 장악하고 있으며, 데이터모니터의 보고에 따르면, 미국, 일본, 유럽의 세계 7대 시장에서 제니칼의 매출은 2억 2,800만 달러이고 리덕틸의 매출액은 1억 2,400만 달러라고 보고됨. 이 외에도 펜터민, 마진돌, 펜디메트라진, 세로토닌계 약물, 리파제 저해제 등이 비만치료제로 쓰이고 있으며, 비만에 관한 높은 관심 속에 새로운 신약 개발이 활발히 이루어지고 있음.

○ 지난 2012년 8월 미국 FDA가 13년 만에 비만 치료에 도움을 줄 수 있는 신약을 승인하였음. 이번에 승인받은 신약은 일반명 로카세린(벨비크)로 엄청난 효능이 있는 약물은 아니지만 식이요법 및 운동요법을 병행하면 체중의 3%를 감량하는데 도움이 된다고 함. 미국 캘리포니아주 아레나 파마슈티컬사에 의해 개발된 벨비크는 신약의 안전성 확보에 가장 어려움을 겪었음.

<표 2-5> 비만치료제 신약 개발 현황

품목	업체명	개발단계
콘트라브	오렉시젠	임상 3상
엠파틱	오렉시젠	임상 2상
퀴백사	바이부스	임상 3상
리라글루타이드	노보노디스크	임상 2상
타스포글루티드	로슈	임상 2상
프람린티드/렘틴	아밀린	임상 2상
타라나반트	머크	임상 3상
CP-945595	화이자	임상 3상
lorcaserin	아레나제약	임상 3상
cetilistat	알리지커	임상 3상

<표 2-6> 미국 다이어트 관련 시장 규모 (단위: US\$ 10억)

구분	2002	2003	2004	2005	2008
다이어트 음료	14.86	16.58	17.08	18.00	22.98
인공 감미료	1.79	1.99	2.06	2.17	2.77
헬스 클럽	13.1	14.1	15.1	16.3	19.72
상업용 체중감량 센터	1.71	1.71	1.83	2.02	2.60
저칼로리 식품	2.40	2.23	2.21	2.37	2.69
식사 대용품	1.41	1.11	1.05	1.18	1.51
메디컬 프로그램	1.73	1.76	1.84	1.95	2.56
체중감량 수술	1.57	2.57	3.50	2.97	4.12
다이어트 알약	0.505	0.434	0.413	0.415	0.715
저열량 식이요법 다이어트 프로그램	0.277	0.310	0.343	0.384	0.501
관련 서적, 비디오	1.38	1.47	1.57	1.67	20.1
전체 시장 규모	39.84	43.68	46.35	48.63	60.96

(출처 : Marketdata Enterprise, Inc)

○ 그러나 이 같이 미국에서 연구 중인 비만 관련 치료제 및 보조제는 그 개발비가 엄청나게 소요되어 거대기업에서 개발 중인 약물 혹은 식품으로 우리나라에서는 이러한 연구진행을 할 수 있는 환경 및 개발 지원이 매우 열악한 실정임. 따라서 다른 분야 개척을 통해 우리기술로 국제적으로 인정받을 수 있는 치료제를 개발하려는 노력은 천연물을 기반으로 한 항비만 치료

제의 개발에서 시작되어야 함. 그러므로 국내의 안전성이 확보된 천연물질을 원료로 비만억제 효과를 나타내는 기능성 식품개발이 먼저 이루어진 후 그 효능을 좀 더 연구하여 신약으로서도 안전하고 안정성이 우수한 치료제 개발로 이루어져야 거액의 자본 투자로 이루어진 외국의 제약시장과 경쟁력을 같이 할 수 있을 것으로 사료됨.

○ 세계 건강기능식품시장은 일반 개발도상국에 비해 미국, 일본과 같은 선진국에서 소비가 활성화 되고 있고 선진국을 중심으로 막대한 국가 예산이 투입됨에 따라 그 성장률도 나날이 증가하고 있음. 또한 중국, 인도와 같은 개발도상국에서도 점점 소득 수준과 건강에 대한 관심도가 높아지면서 건강기능식품에 대한 수요가 늘어나고 있음. 또한 의약품과 화장품 시장이 해마다 4~5%의 성장률을 보이는데 비해 건강기능식품 시장은 10% 이상의 높은 성장률을 보이며, 웰빙에 대한 관심도가 높아짐에 따라 건강기능식품이 시장에서 차지하는 비중은 점점 커지고 있음.

○ 비만을 비롯한 성인병이 점차 증가하고 그에 대한 관심이 증가됨에 따라 건강기능식품 시장도 점차 커지고 있음. 미국의 건강기능식품 시장 규모는 2003년도 637억 달러에서 2005년도에 742억 달러, 2006년 849억 달러로 그 규모가 급격히 성장하고 있음. 미국의 경우 영양과 기능성식품에 대한 인식 및 지식이 높은 수준이고, 건강기능성 식품 섭취기간도 상대적으로 긴 편에 속하고 건강을 지키기 위한 예방차원의 섭취라는 인식이 강하며, 건강기능성 식품의 대부분이 비타민, 무기질 관련 품목이 주를 이루고 있으나 2009년에는 오메가3, 코엔자임 Q10의 성장이 특색을 보임. [출처] 건강기능식품 산업 동향 ((사)한국친환경농산물가공생산자협회)

<표 2-7> 미국 기능성 식품 품목

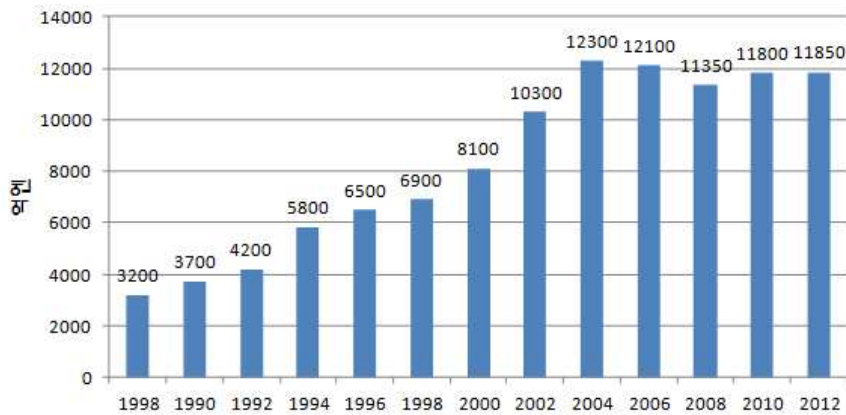
(단위: 천만 달러, %)

구분	2003년	2004년	2005년	성장률	2005~2008년 성장률
비타민	6,650	6,890	7,010	1.8%	2~5%
허브/식물류	4,180	4,300	4,390	2.1%	1~2%
스포츠뉴트리션	1,980	2,100	2,220	5.8%	4~6%
미네랄류	1,760	1,740	1,750	0.4%	3~5%
식이보충용	2,520	2,320	2,250	-2.9%	2~5%
특별식/기타	2,710	2,980	3,220	8.2%	7~9%
유기식품	16,240	18,380	20,700	13%	8~12%
기능식품	22,730	24,460	26,660	9%	6~8%
자연 퍼스널 케어	4,920	5,470	5,940	8%	10~12%
총 건강산업	63,690	68,640	74,150	8%	5~7%

(출처: Nutrition Business Journal (2006))

○ 2012년 일본 건강식품 시장은 2004년 1조 2,300억 엔으로 최고치를 달성하였으나 점차 성장률은 둔화되고 있는 실정임(그림 4). 그러나 뼈 관절 건강식품이나 미용식품 등이 증가추이를

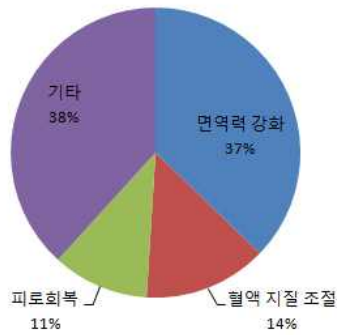
보이고 있으며, 세계적으로 계속해서 증가하는 대사증후군 관련 연구를 통해 혈당개선소재, 혈압강화소재 및 체지방·내장지방 감소 소재, 식욕억제 소재 개발이 활발히 진행. 이처럼 건강기능식품 이용자의 폭이 넓어지고 있는 추세로 성장률은 다시 살아날 것으로 전망임. 일본의 경우 대사증후군의 임상적 지표들과 관련되어 특정보건용으로 제품화가 되어 있고, 일본 내 시장 점유율이 높은 제품들로는 체지방, 혈당, 혈압 등 단일지표 효능을 갖는 제품들이 주를 이룸. 그 예로 녹차 카테킨 성분으로 체지방 억제를 시키는 헬시아 (가오), 지방의 흡수를 억제하고 혈중 중성지방 20%를 감소시키는 흑우통차 (산토리), 식후 혈당 상승억제 식품인 반소레이차 (야쿠르트)와 구아바 등이 있고 고혈압 예방음료인 아밀S (칼피스) 등이 있음. 또한 아직 특정보건용으로 제품화 되진 않았지만, 대사증후군 관련 소재로 연구되고 있는 것으로는 대사증후군의 주요원인인 비만 조절로써 내장지방 조절 기능을 가진 제품으로 헤르캄푸레, 생커피추출물, 흑두 종피 추출물등이 있음. (출처: 식품산업과 영양)



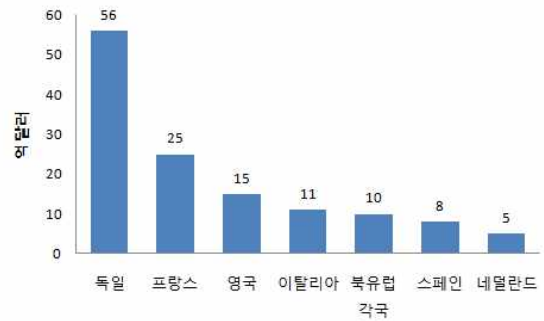
<그림 2-4> 일본 건강식품 시장 추이(특정보건용 식품 제외)

(출처:GMP 재팬)

○ 또한 중국인의 생활수준이 향상됨에 따라 건강기능식품 시장은 40~50%의 속도로 성장하고 있으며, 이중 면역력 강화 (37.3%)와 피로 회복 (10.8%) 등이 주류를 이루고 있음. 또한 생활수준의 향상으로 비만에 대한 관심이 높아지고 있어 혈액 지질 조절 (13.8%)과 같은 비만 관련 건강기능식품이 증가하고 있음 (그림 2-5).



<그림 2-5> 중국 건강식품시장 규모
(출처 : 건강기능식품)



<그림 2-6> 유럽 각국의 건강기능식품 시장
(출처 : 식품저널(2008))

○ 2008년 ‘식품유통연감’ 자료에 따르면, 유럽의 건강기능식품 시장은 미국에 이어 두 번째로, 세계 시장의 24%를 차지하고 그림 2-6에서 보는 바와 같이 국가별 규모로는 독일이 가장 크고 다음은 프랑스, 영국, 이탈리아순이며 현재 시장에서 판매되고 있는 건강기능식품은 크게 심장, 뼈, 장질환을 타깃으로 개발·판매되고 있으며, 유럽 또한 증가하는 대사성 질환에 관심을 기울이고 있음. 특히 대사성 질환인 고혈압은 다른 심장질환인 혈관성 질환과는 달리 건강기능식품으로 치료 및 예방이 가능하고 또한 권장되고 있어 수요가 증대되는 추세임.

제 2 절 개발기술의 산업화 방향

1. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

○ 본 발명은 체지방 감소를 위한 건강기능성식품에 관한 것으로 제주도에서 자생하는 곶솔과 경단구슬모자반 추출물을 이용하여 그 원료내 체지방 감소 활성 성분을 다량 함유한 표준화된 최적추출공법으로 제조된 곶솔과 경단구슬모자반의 엑스를 개발하여 이 원료를 식품의약품 안전처의 허가과 인증을 받아 우수한 제품으로 개발하고자 하는 목표로 진행되었음.

○ 개발 원료로 제주도에 자생하는 곶솔과 경단구슬모자반을 이용하였기에 그 지역에서 자생하는 농작물의 생산량 증대 효과와 더불어 국내 품종의 우수성을 국제적으로도 알리고자 하였으며 더 나아가 국제시장 진출로 국가경쟁력 확보에 따른 브랜드 창출 및 신기술 보유에 의한 부가가치 창출에 도움을 줄 수 있는 고부가가치 식품개발을 이루고자 함.

○ 매년 젊은층의 비만인구는 급속도로 증가하고 있으므로, 체중감소를 타깃하는 안전성 있는 제품개발에 중점을 두어 젊은 소비층을 대상으로 복용하기 쉬운 정제 형태 또는 캡슐형태로 제조하여 판매할 계획임.

○ 개발에서 판매까지 소요되는 기간이 비교적 짧은 기능성 식품개발을 진행할 경우, 첫 제품

개발 시기부터 빠르게 생산량을 늘리고 마케팅과 홍보를 강화하여 식품에 대한 효능의 우수성을 확보하여 제품의 이미지 향상에 주력한 후 판매량을 늘리는 전략도 고려하여 산업화 방향을 설정할 계획임.

제 3 절 국내외 개발기술 현황

1. 특허 분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	특허정보원 DB(www.kipris.or.kr), Aureka DB
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		체지방 감소 건강기능식품 개발	체지방 감소 건강기능식품 개발
Keyword		경단구슬모자반, 비만	경단구슬모자반, 알리지
검색건수		4	2
유효특허건수		4	2
핵심특허 및 관련성	특허명	경단구슬모자반 추출물을 이용한 항비만제 조성물	경단구슬모자반 추출물 또는 이로부터 분리한 유효물질을 이용한 알리지성 질환의 개선제 조성물
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2014년 02월	2013년 08월
	관련성(%)	100 %	70 %
	유사점	경단구슬모자반 추출물을 이용한 항비만제 조성물	경단구슬모자반 추출물
	차이점	-	알리지성 질환의 개선제 조성물

개발기술명		체지방 감소 건강기능식품 개발	체지방 감소 건강기능식품 개발
Keyword		경단구슬모자반, 화장료 조성물	경단구슬모자반, 간기능
검색건수		4	1
유효특허건수		2	1
핵심특허 및 관련성	특허명	광독성이 낮은 모자반 추출물 제조방법 및 이를 함유하는 화장료 조성물	간 기능 개선용 조성물
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2011년 05월	2014년 06월
	관련성(%)	30 %	40 %
	유사점	경단구슬모자반 추출물	경단구슬모자반 추출물
차이점	티로시나제 활성 억제효과와 멜라닌 생합성 억제효과, 피부주름의 개선효과의 화장료 조성물	복합 추출물, 간기능 개선용 조성물	

개발기술명		체지방 감소 건강기능식품 개발	체지방 감소 건강기능식품 개발
Keyword		경단구슬모자반, 염증	블렌시아 살미엔티, 체지방감소
검색건수		7	3
유효특허건수		1	1
핵심특허 및 관련성	특허명	아포-9'-푸코잔티논 화합물을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방 및 치 료용 조성물	카테킨을 함유하는 블렌시아 살미엔티 추출물의 제조방법, 이에 의해 제조된 카테킨을 함유하는 블렌시아 살미엔티 추출물, 이를 포함하는 고농도 카테킨 과립차 및 이를 포함하는 체내 활성산소 제거, 비만조절 및 체지방개선용 식품 조성물
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2014년 07월	2014년 04월
	관련성(%)	50 %	50 %
	유사점	경단구슬모자반 추출물 및 아포-9'- 푸코잔티논(apo-9'-fucoxantinone) 유효성분	비만조절 및 체지방개선용 식품 조성물
차이점	아포-9'-푸코잔티논(apo-9'-fucoxanti none)을 유효성분으로 포함하는 염증질환 또는 면역질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물	카테킨을 함유하는 블렌시아 살미엔티 추출물의 체내 활성산소 제거 및 항바이러스 효과	

개발기술명		체지방 감소 건강기능식품 개발	체지방 감소 건강기능식품 개발
Keyword		항비만, 모자반추출물	해양추출물, 지방축적억제
검색건수		3	10
유효특허건수		1	1
핵심특허 및 관련성	특허명	해양생물 추출물을 포함하는 항비만용 리파아제 저해제	푸코스테롤을 함유하는 항비만 조성물
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2012년 07월	2012년 06월
	관련성(%)	80 %	40 %
	유사점	항비만용 기능성식품	지방세포의 지방 합성 억제
	차이점	해양생물 추출물을 포함하는 항비만용 리파아제 저해제	열 발생기전에 관여하는 UCPs 유전자 발현 측정

개발기술명		체지방 감소 건강기능식품 개발	체지방 감소 건강기능식품 개발
Keyword		natural product, obesity	대사질환, 돌외 추출물
검색건수		4	4
유효특허건수		1	1
핵심특허 및 관련성	특허명	리파아제(lipase) 저해제 조성물	돌외 추출물로부터 다물린 A 및 다물린 B를 대량으로 분리하는 분리방법
	보유국	일본	대한민국
	등록년도	2013년 05월	2014년 10월
	관련성(%)	30 %	50 %
	유사점	지방축적 억제기전	비만, 당뇨, 고지혈증 등을 포함하는 대사질환 치료
	차이점	천연물	AMPK 활성화 및 유효성분 분리방법

2) 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	미국, 일본, 유럽
논문 DB	Aureka DB, pubmed DB(www.ncbi.nlm.nih.gov), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

개발기술명		체지방 감소 건강기능식품 개발	체지방 감소 건강기능식품 개발
Keyword		body fat, natural product	Alga <i>Sargassum muticum</i> (Yendo) Fensholt
검색건수		2,849	3
유효논문건수		95	2
핵심논문 및 관련성	논문명	Anti-obesity effect of Artemisia capillaris extracts in high-fat diet-induced obese rats.	Anti-inflammatory effects of apo-9'-fucoxanthinone from the brown alga, <i>Sargassum muticum</i> .
	학술지명	Molecules	DARU Journal of Pharmaceutical Sciences
	저자	Dong Wook Lim <i>et al.</i>	Eun-Jin Yang <i>et al.</i>
	게재년도	2013년	2013년
	관련성(%)	80%	30%
	유사점	high-fat diet (HFD)-induced 비만 동물모델로 실험	경단구슬모자반을 이용한 연구
	차이점	천연물 추출법	항염증에 관한 연구

개발기술명		체지방 감소 건강기능식품 개발	체지방 감소 건강기능식품 개발
Keyword		<i>Sargassum muticum</i> , allergy	<i>Sargassum muticum</i> , anti-oxidant
검색건수		1	7
유효논문건수		1	2
핵심논문 및 관련성	논문명	Allergic contact eczema caused by <i>Sargassum muticum</i> in professional fishermen on Lake Grevelingen	Antioxidant, antiproliferative, and antiangiogenesis effects of polyphenol-rich seaweed (<i>Sargassum muticum</i>).
	학술지명	Ned Tijdschr Geneeskd.	Biomed Res Int.
	저자	van der Willigen AH <i>et al.</i>	Namvar F <i>et al.</i>
	게재년도	1988년	2013년
	관련성(%)	30%	30%
	유사점	경단구슬모자반 추출물	경단구슬모자반 추출물
	차이점	항알러지 연구 기전	항산화 연구 기전

개발기술명		체지방 감소 건강기능식품 개발	체지방 감소 건강기능식품 개발
Keyword		<i>Sargassum muticum</i> , apoptosis	natural product, anti-obesity
검색건수		1	514
유효논문건수		1	130
핵심논문 및 관련성	논문명	The ethyl acetate fraction of <i>Sargassum muticum</i> attenuates ultraviolet B radiation-induced apoptotic cell death via regulation of MAPK- and caspase-dependent signaling pathways in human HaCaT keratinocytes.	Anti-obesity effect of <i>Gymnema sylvestre</i> extract on high fat diet-induced obesity in Wistar rats.
	학술지명	Pharm Biol	Drug Res (Stuttg)
	저자	Piao MJ <i>et al.</i>	V. Kumar <i>et al.</i>
	게재년도	2014년	2013년
	관련성(%)	30%	70%
	유사점	경단구슬모자반 추출물	항비만 활성 연구
	차이점	apoptosis 기전 연구	천연물 원료

개발기술명		체지방 감소 건강기능식품 개발	체지방 감소 건강기능식품 개발
Keyword		경단구슬모자반, 항균 및 항산화	natural product, anti-obesity
검색건수		1	20
유효논문건수		1	5
핵심논문 및 관련성	논문명	경단구슬모자반(Sargassum muticum) 추출물의 항산화 및 항균활성	Anti-obesity effects of <i>Lysimachia foenum-graecum</i> characterized by decreased adipogenesis and regulated lipid metabolism
	학술지명	Korea Institute of Science and Technology Information	Experimental & Molecular Medicine
	저자	김지영, 이정아, 김길남, 윤원중, 이욱재, 박수영	Jong Bae Seo <i>et al.</i>
	게재년도	2007년	2011년
	관련성(%)	30%	70%
	유사점	경단구슬모자반을 이용한 연구	adipocyte-specific gene 발현 확인
	차이점	항산화 및 항균활성	anti-lipogenic effect 확인

개발기술명		체지방 감소 건강기능식품 개발	체지방 감소 건강기능식품 개발
Keyword		metabolic syndrome, hyperlipidemia, natural product	metabolic syndrome, cholesterol, natural product
검색건수		56	145
유효논문건수		19	
핵심논문 및 관련성	논문명	The role of green tea extract and powder in mitigating metabolic syndromes with special reference to hyperglycemia and hypercholesterolemia	High-Fat Diet Reduces the Formation of Butyrate, but Increases Succinate, Inflammation, Liver Fat and Cholesterol in Rats, while D ietary Fibre Counteracts These Effects
	학술지명	J Transl Med	PLoS One
	저자	Hu X et al.	Jakobsdottir G et al.
	게재년도	2014년	2013년
	관련성(%)	60%	60%
	유사점	고지혈증 억제효과	천연물 추출물
	차이점	과혈당, 간기능이상 등 복합 억제효과 탐구	low-fat and high-fat diets 두군으로 나눠서 비교 실험

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 경단구슬모자반을 이용한 체지방 감소 건강기능식품개발

1. 경단구슬모자반 원료수급

가. 원료수급

- (1) 모자반속은 갈조강(Phaeophyceae) 모자반목(Fucales) 모자반과(Sargassaceae)에 속하는 대형갈조류로써 주로 온대역의 태평양 서안, 인도양, 호주 연안에 널리 분포하며, 400여 종을 포함하는 매우 큰 분류군임.
- (2) 한국산 모자반속 식물 대부분이 속한 *Bactrophyucus* J. Agardh는 일본, 중국을 포함한 동부 아시아 주변 해역에만 분포하고 있으며, 조하대에서 해중립을 형성하여 생태학적으로 중요하고 한국산 모자반속 식물은 22종 2품종의 24종이 전 연안에 분포하고 있으면, 해안선을 따라 암반 지대에 군락을 이루고 있음.



<그림 3-1> 경단구슬모자반 암반 부착 광경



<그림 3-2> 경단구슬모자반

- (3) 경단구슬모자반은 가을에 싹이 나서 겨울에서 봄까지 무성하고 4~5월에는 번식기이고 이 시기가 지나면 없어짐. 제주도 해역의 총 생산량은 20~30톤 정도이며, 수확 시기는 1월 중순에서 2월 초순경임. 원료의 확보는 어촌계에서 대량 구매가 가능하고, 참모자반의 경우(Hwang et al., 2005, 2006, 2007) 양식이 가능하여 현재 제주도 해역에서 생산되는 양을 초과 할 경우에는 제주도에서도 경단구슬모자반 양식을 도입을 추진할 가능성도 있음.

(4) 경단구슬모자반 생산량 및 생산시기

추자도(15Ton)			우도(5Ton)				성산포(수량)	
영흥	예초	대서	조일	천진	서광	오봉	시흥리	오조리
○ 제주도 해역 경단구슬모자반 생산량 20~30Ton								
○ 수매가격 : 10,000~12,000/kg(건중량)								
○ 소비자 판매가격 : 16,000~20,000/kg(건중량)								
○ 경단구슬모자반 자생지 현황								
○ 우도해역, 성산포 해역 및 추자도 해역								

(5) 안정된 원료 확보를 위해 채집 지역 선정

(가) 제주도 어촌계와의 협의를 통해 대량 구매로 원료 확보 제주도 제주도 우도면

(나) 경단구슬모자반 원료 대량 확보 계획 및 채집일

<표 3-1> 경단구슬모자반 채집일 및 채집량

채집일	채집량(kg)
2012년 1월 30일	650
2012년 2월 9일	1,350
2012년 2월 22일	500
합계	2,500kg

(다) 경단구슬모자반 원료 대량 확보 현장



<그림 3-3>
경단구슬모자반 채집



<그림 3-4>
경단구슬모자반 작업 모습



<그림 3-5>
채집된 경단구슬모자반

(라) 우도에서 대량 확보된 경단구슬모자반 표본 확립



<그림 3-6> 경단구슬모자반 표본

2. 경단구슬모자반의 최적 추출 조건 확립

가. 경단구슬모자반의 최적 추출과정 확립을 위한 Lap scale 천연물 추출조건

(1) 추출방법 : 경단구슬모자반을 채취하고 염분을 제거하기 위해 물로 3회 세척함. 이렇게 얻어진 생물원료를 40℃ 열풍건조하여 원료를 미립으로 분쇄하여 에탄올에 침출하여 24시간 동안 진탕 추출함. 추출물을 여과 후 2차 침출하여 24시간 진탕 추출 후 1,2 추출액을 감압 농축함. 감압 농축된 추출물을 증류수로 용해하여 냉동 후 동결건조하여 최종 분말 추출물을 얻어냄.

(2) 추출방법



<그림 3-7> 경단구슬모자반 추출방법 모식도

나. 용매농도별 추출수율에 따른 추출조건

(1) 방법 : 경단구슬모자반 분말시료 10g 당 20배에 해당하는 에탄올 200ml 침출하여 추출함. 적정 추출수율 탐색을 위해 에탄올 농도별 (0, 20, 40, 60, 80, 100%) 추출함.

(2) 결과 : 농도가 높아질수록 추출수율이 낮아지는 경향을 나타냄.

<표 3-2> 경단구슬모자반 용매별 추출량과 추출수율

용매농도(%)	추출량(g)	추출수율(%)
D.W	3.1 ± 0.3	30.7
20	1.7 ± 0.7	16.8
40	1.2 ± 0.3	11.7
60	1.0 ± 0.3	10.0
80	0.6 ± 0.1	6.5
100	0.3 ± 0.1	3.2

다. 추출용매 및 추출시간에 따른 추출수율 비교

(1) 방법 : 수율과 활성 결과를 검토하여 경단구슬모자반 60% 에탄올 추출물 선정함. 경단구슬 모자반 분말시료 3g을 각각 70ml의 60% 에탄올과 60% 주정을 이용하여 추출함.

- 추출시간은 각각 12시간, 24시간으로 하여 추출 수율을 확인

※ 추출수율 산정 및 실험법은 대한약전 9개정 묶은 에탄올 엑스정량법을 따름










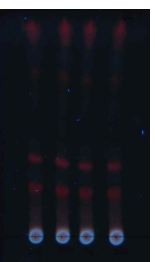
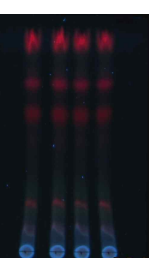

(2) 결과 : 60% 에탄올 추출물과 주정 추출물간의 수율 차이는 에탄올 추출물에 비해 주정 추출물이 12시간 침출시간일 때는 3.6%, 24시간 침출시간일 때는 12.6 % 높게 나타났음.


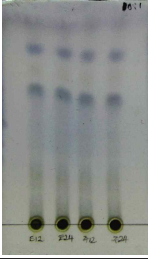

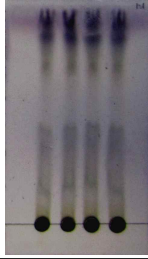
(가) 추출용매 및 침출시간에 따른 수율 차이

<표 3-3> 경단구슬모자반 추출용매 및 침출시간에 따른 수율

용매	침출시간(hr)	추출량(g)	추출수율(%)	수율차이(%)
60% 에탄올	12	0.454	15.1	
	24	0.925	30.8	
60% 주정	12	0.562	18.7	+ 3.6
	24	1.304	43.5	+ 12.6

(나) Normal phase TLC chromatography

	CM=30:1	CM=10:1	CM=3:1	CM=1:1	비고
발색 전					
UV 254nm					Rf별 특이적 성분 차이 없음 (C: chloroform, M: methanol, 발색= anis-aldehyde)
UV 365nm					

발색반응					
시료 순서	60% EtOH, 12hr	60% EtOH, 24hr	60% 주정, 12hr	60% 주정, 24hr	

3. 경단구슬모자반의 GMP-Pilot Scale 추출 공정 확립

가. 대량 생물원료 대량확보 및 시료 전처리

(1) 방법

(가) 2012년 1~2월 우도에서 경단구슬모자반 2,500kg 확보

(나) 염분제거를 위해 물로 3회 세척

(다) 40℃ 열풍건조기에서 4~5일 걸쳐 건조 후 분쇄하여 분말시료 300kg 확보



① 생물원료 확보



② 세척



③ 건조준비



④ 건조



⑤ 대용량건조기



⑥ 대용량분쇄기

<그림 3-8> 경단구슬모자반 대량 추출을 위한 시료 전처리 방법

나. GMP-Pilot Scale 추출과정

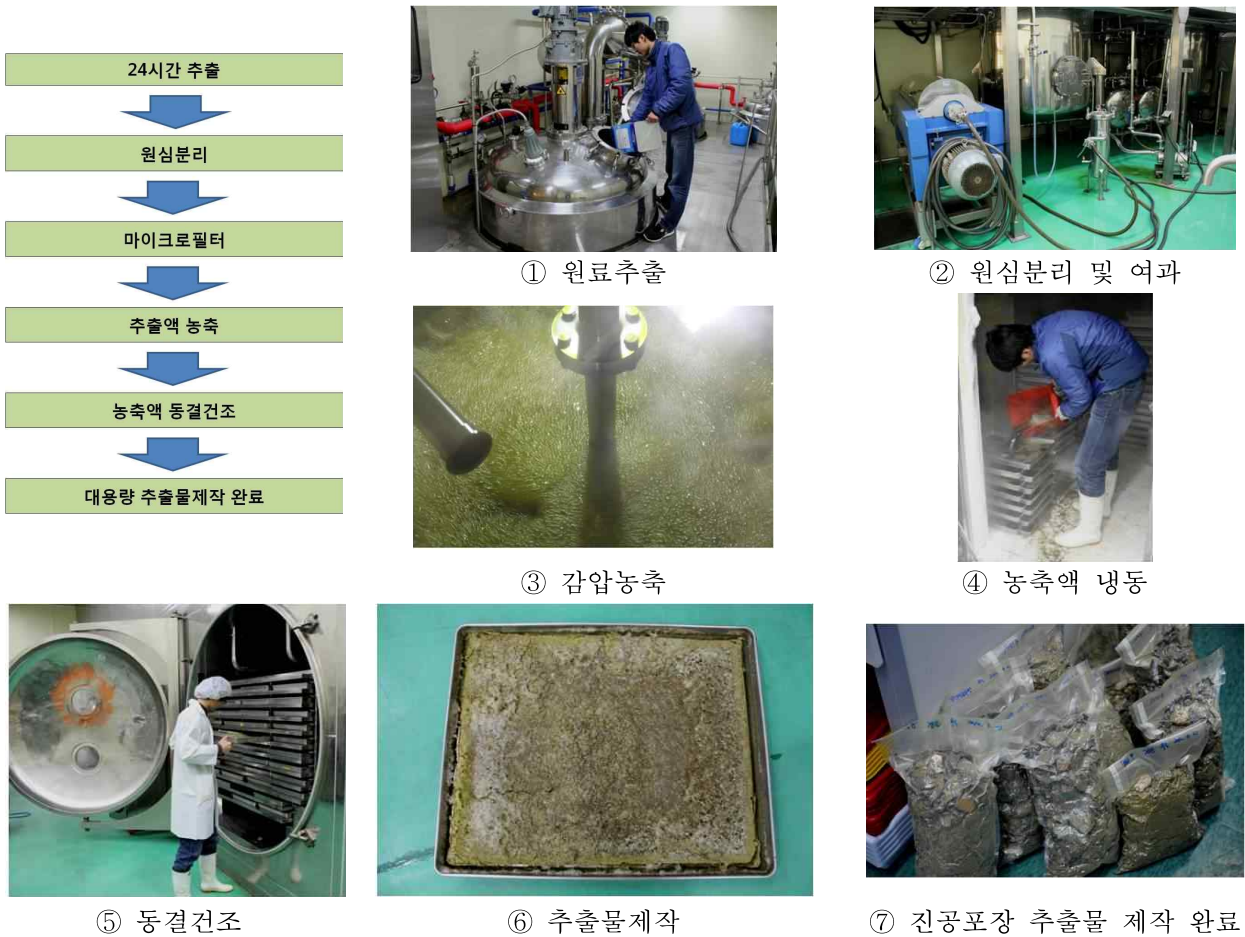
(1) 방법 : 분말시료와 용매를 혼합하여 적정온도와 시간동안 추출함. 원심분리하여 분말시료와 용매를 분리하고 마이크로필터로 여과함. 여과된 추출액을 감압농축한 후 농축액을 냉동함. 냉동된 농축액을 동결건조하여 대용량 추출물을 확보함.

(2) 추출장비



대용량추출공장 전경 추출기 감압농축기 동결건조기
 <그림 3-9> 경단구슬모자반 대량 추출을 위한 추출장비

(3) 추출방법



<그림 3-10> 경단구슬모자반 대량추출방법 모식도

다. 경단구슬모자반 추출물 대량제작

(1) 방법

- 경단구슬모자반 분말시료 300kg을 100kg씩 3회에 걸쳐 추출
- 95% 주정 1,260L와 정수 740L를 추출기에 넣어 혼합하여 60% 주정 제조
- 경단구슬모자반 분말시료 100kg을 추출기에 투입하여 50℃에서 24시간 침출
- 추출액을 원심분리 후 10 μ m 필터로 여과 후 농축
- 농축액을 동결건조 후 추출물 60kg 확보

4. 영양성분 분석 및 잔류농약 검사

가. 영양성분 검사와 잔류농약 검사가 가능한 공인기관 의뢰

(제주대학교 생명과학기술혁신센터, 한국기능성식품연구원)

나. 시험 결과

- 잔류농약 시험항목인 5가지항목 (비에치씨. 디디티. 알드린. 디엘드린. 엘드린)이 모두 검출되지 않았으며, 영양분석은 3번 반복 실험 결과 아래와 같음.

(1) 경단구슬모자반 영양분석 결과

<표 3-4> 경단구슬모자반 영양분석 자료

분석항목	경단구슬모자반
열량	185.1 ± 2.2
탄수화물	23.1 ± 16.6
수분	4.9 ± 0.4
회분	51.6 ± 1.2
단백질	9.0 ± 0.5
지방	2.3 ± 0.4
식이섬유	14.4 ± 0.7
납	0.2 ± 0.1
카드뮴	0.1 ± 0.1
총수은	불검출
총비소	205.6 ± 17.7
나트륨	3267.8 ± 162.7
대장균	음성

* 검사성적서


(1) 영양분석 검사성적서

검사	정	오현정 (인)
책임자	부	이주연 (인)
전화번호	(064) 754-2136	

검 사 성 적 서

발급번호 IB20130712-0003

접수번호 일반-13-457-1

제품명		JBRI 20120313		제조일자나 유통기한		-	
의뢰인	업소명	(재)제주테크노파크		성명	한영섭		
	소재지	제주특별자치도 서귀포시 남원읍 신례동로 338					
접수년월일		2013. 7. 2		검사완료일	2013. 7. 12		
식품유형(재질)		-					
검사목적		참고용					
시험항목 및 결과							
검체명	시험항목	기준	결과	단위	항목판정		
JBRI 20120313	열량	-	187.3	kcal/100g	-		
	탄수화물	-	32.8	g/100g	-		
	수분	-	4.9	g/100g	-		
	회분	-	50.8	g/100g	-		
	단백질	-	9.6	g/100g	-		
	지방	-	2.0	g/100g	-		
	식이섬유	-	15.1	g/100g	-		
	납	-	0.3	mg/kg	-		
	카드뮴	-	0.1	mg/kg	-		
	총수은	-	불검출	mg/kg	-		
	총비소	-	204.0	mg/kg	-		
	나트륨	-	3161.5	mg/100g	-		
	대장균	-	음성	-	-		
판정 : -		검사자 : 이주연, 백진우, 강은옥					
비고		※상기 판정은 의뢰된 시험항목에 한함					
위와 같이 검사성적서를 발급합니다.							
2013 년 7 월 12 일							
제주대학교생명과학기술혁신센터장 <div style="float: right; text-align: right;">  </div>							

(2) 잔류농약 검사성적서

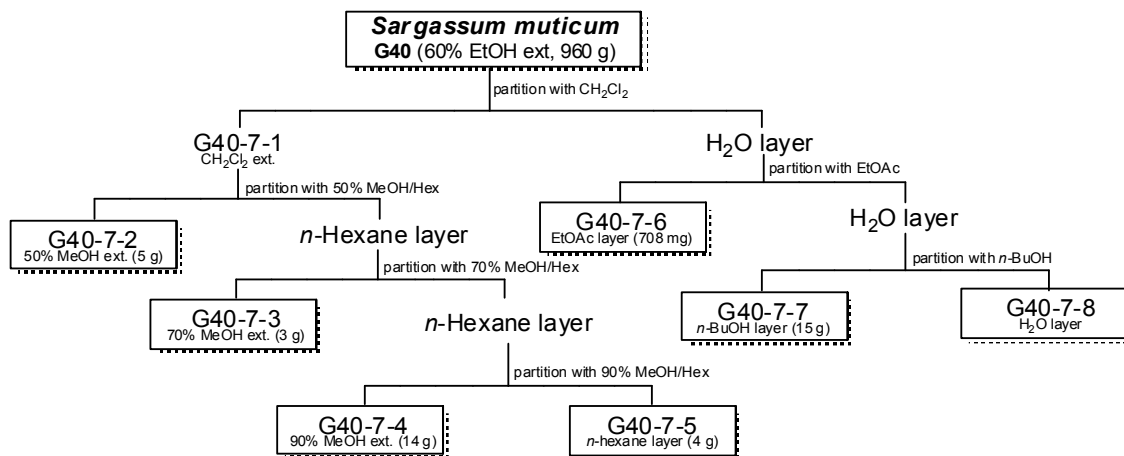
제 D2013090317 호			
검 사 성 적 서			
검체명	경단구슬모자반추출물-I	제조일자 (유통기한)	2013-06-12
의뢰인	업체명	(재)제주테크노파크	성명
	주소	제주 제주시 중앙로 217 (이도이동, 제주벤처마루9층)	
제조번호		접수년월일	2013-09-10
검사의뢰목적	제출용	검체접수번호	D2013090317
귀하가 우리 연구원에 검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다. 검사관련 총 책임자: 김 천 희			
시험항목	결과	검사담당자	
비에치씨(mg/kg)	불검출	이선미	
디디티(mg/kg)	불검출	이선미	
알드린(mg/kg)	불검출	이선미	
디엘드린(mg/kg)	불검출	이선미	
엔드린(mg/kg)	불검출	이선미	
2013 년 9 월 16 일 한국기능식품연구원			
(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호(031)628-2400 FAX(031)628-0400-1			

5. 경단구슬모자반의 지표성분 및 유효성분 분석

가. 경단구슬모자반의 metabolite 분리정제 및 구조규명

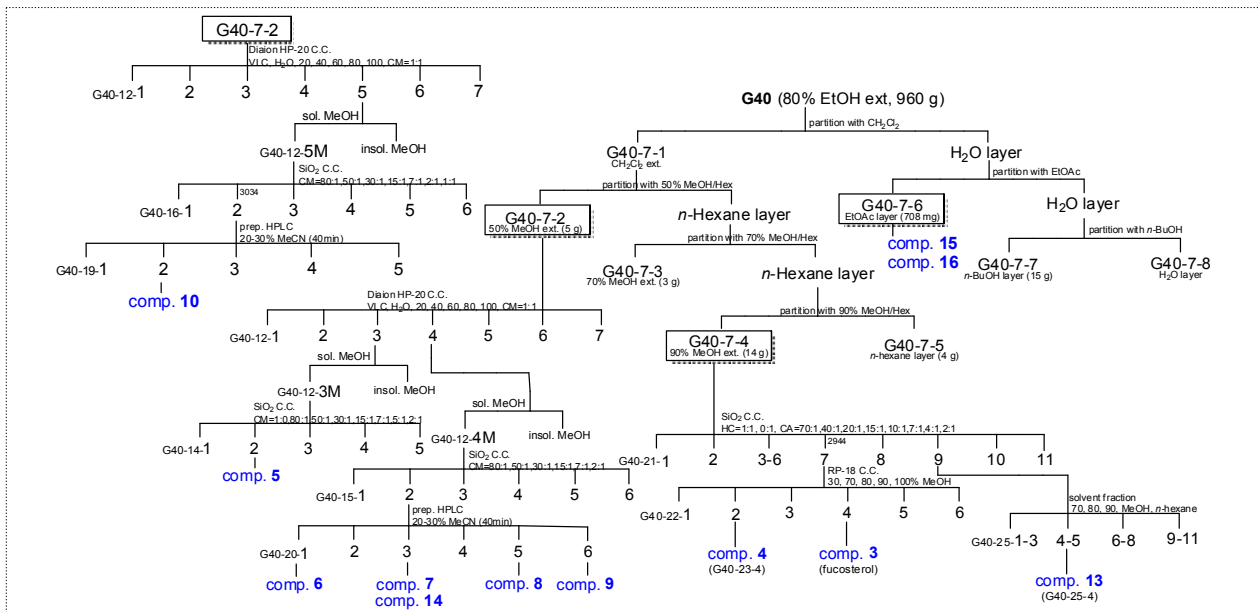
(1) 건조 경단구슬모자반 (G40)의 H₂O, 20%, 40%, 60%, 80%, 95% 에탄올 추출물에 대하여 Oil Red O assay를 통해 유의성 있는 활성이 확인되어진 60% 에탄올 경단구슬모자반 추출물을 선정하여 활성물질을 분리하고 정제하기 위한 연구를 수행함.

(2) 분획 방법 : 경단구슬모자반의 건조물 10 Kg을 60% 에탄올로 2회 반복 추출하였으며, 추출액을 여과한 후 여액을 회전 감압 농축기로 농축하여 60% 에탄올 추출물 (960 g)을 얻어냄. 에탄올 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH로 용매 분획하였으며, CH₂Cl₂ 분획물에 대하여 *n*-Hexane으로 현탁하여 50% MeOH, 70% MeOH, 90% MeOH, *n*-Hexane으로 각각 극성별로 용매 분획물을 얻음. 이들 분획 중 활성이 확인된 50% MeOH, 90% MeOH, EtOAc 추출물에 대하여 activity guided fractionation 및 pure compound screening 방법을 이용하여 column chromatography 기법으로 분리함 (도식 3-1).



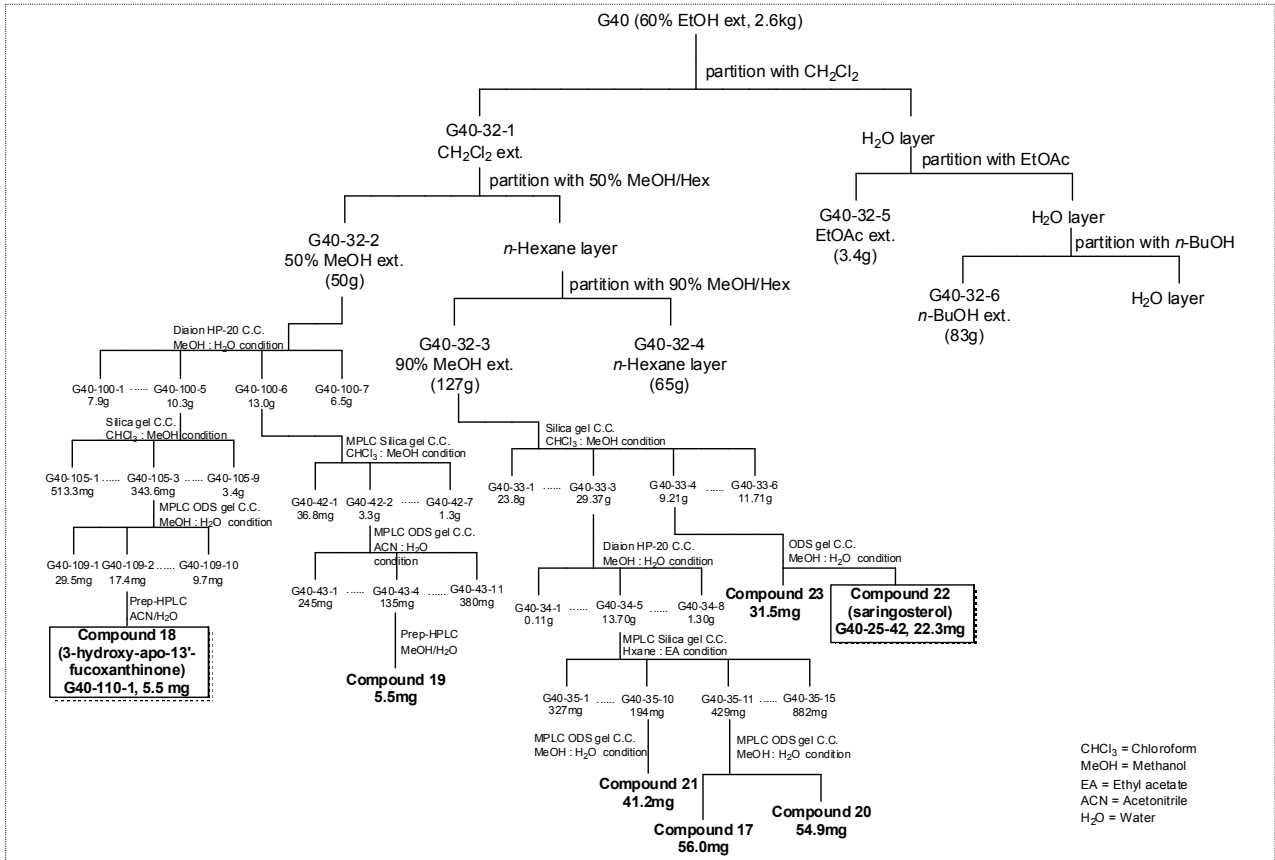
<도식 3-1. *Sargassum muticum* (G40) 추출물의 분획>

(3) 경단구슬모자반의 60% 에탄올 추출물로 활성물질 및 지표성분을 찾기 위해 추출물을 분획하고, column chromatography (CC) 및 prep-HPLC를 통해 활성물질로써의 순수물질을 분리하고 정제함. 50% MeOH 추출물 (G40-7-2) 4.5g에 대해 충전제 Diaion HP-20을 이용하여 H₂O, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% MeOH, CH₂Cl₂-MeOH=1:1의 이동상에 따라 7 개의 fraction (G40-12-1~7)을 얻어냄. 이 중 G40-12-3, G40-12-4, G40-12-5 분획물에 대하여 silica gel (70-230 mesh) CC 및 prep-HPLC (이동상 20-30% MeCN, ODS column, 20mL/min)을 통하여 화합물 5-10, 14를 분리정제 함. 또한, 50% MeOH 추출물 (G40-7-2) 13g에 대해 충전제 silica gel column (70-230 mesh)을 이용하여 Hexane/CH₂Cl₂/acetone system의 순차적인 gradient에 따라 11개의 소분획 (G40-21-1~11)을 얻어냄. 이 중 G40-21-7 와 G40-21-9 분획물에 대하여 silica gel (70-230 mesh) CC 및 RP-18 CC을 통하여 화합물 3, 4, 13을 분리정제 함. EtOAc 추출물 (G40-7-6)으로부터는 화합물 15와 16을 단일화합물로 분리정제 함. 활성물질 및 지표성분의 분리 정제의 과정은 아래와 같음 (도식 3-2).



<도식 3-2. Isolation of Compounds 1-16>

(4) 경단구슬모자반의 60% 에탄올 추출물(2.6 Kg)을 증류수에 현탁시킨 후 CH₂Cl₂, EtOAc, BuOH로 용매 분획하였으며, CH₂Cl₂ 분획물에 대하여 *n*-Hexane으로 현탁하여 50% MeOH, 90% MeOH, *n*-Hexane으로 각각 극성별로 용매 분획물을 얻음. 이들 분획 중 활성이 확인된 50% MeOH, 90% MeOH 추출물에 대하여 activity guided fractionation 및 pure compound screening 방법을 이용하여 column chromatography 기법으로 분리함 (도식 3-3).



<도식 3-3. Isolation of Compounds 18-23>

나. 분광학적 분석 data를 통한 분리정제 단일화합물의 구조 규명

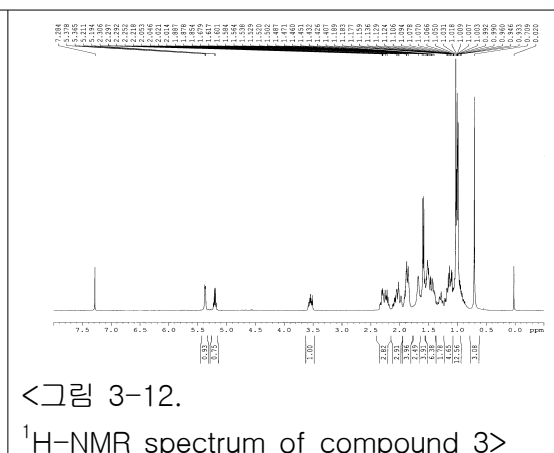
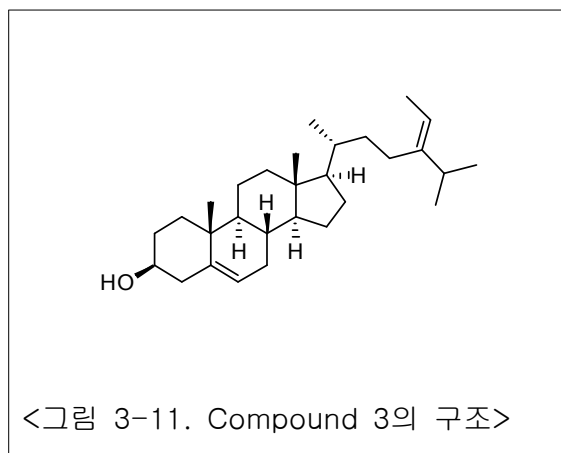
(1) NMR data (^1H -, ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC)를 통한 proton과 carbon의 connectivity에 대한 정보 및 mass data를 이용한 molecular formula의 확인하고 결정된 구조에 대한 data를 기존 문헌과 비교 확인

(2) 구조규명 결과

(가) 지표물질 및 유효물질 구조 규명 NMR 결과

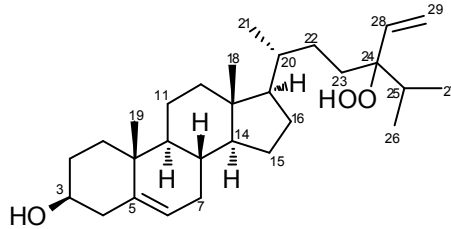
① Identification of compound 3 (fucosterol)

- White amorphous powder; ESI-MS m/z 435 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.37 (1H, m, H-6), 5.20 (1H, q, $J = 13.6, 6.8$ Hz, H-28), 3.55 (1H, m, H-3), 1.56 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-29), 1.01 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-21), 1.03 (3H, s, H-19), 1.00 (6H, d, $J = 6.5$ Hz, H-26/H-27), 0.72 (3H, s, H-18)

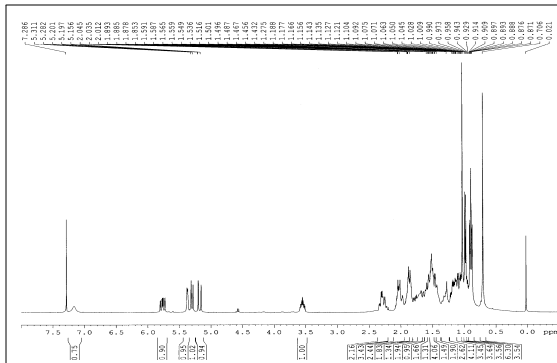


② Identification of compound 4 (24-hydroperoxy-24-vinyl-cholesterol)

- White amorphous powder; ESI-MS m/z 451 $[M+Na]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.74 (1H, ddd, $J = 18.0, 11.2, 2.8$ Hz, H-28), 5.37 (1H, m, H-6), 5.30 (1H, td, $J = 11.5, 1.6$ Hz, H-29), 5.18 (1H, dd, $J = 18.0, 1.6$ Hz H-29), 3.55 (1H, m, H-3), 1.03 (3H, s, Me-19), 0.98 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-21), 0.91 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-26), 0.88 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-27), 0.71 (3H, s, Me-18); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 140.7 (C-5), 137.2 (C-28), 121.7 (C-6), 116.3 (C-29), 89.1 (C-24), 71.8 (C-3), 55.9 (C-17), 50.1 (C-9), 42.7 (C-13), 39.7 (C-12), 37.2 (C-10), 37.2 (C-4), 36.5 (C-1), 36.2 (C-8), 35.9 (C-20), 31.9 (C-2), 31.6 (C-22), 31.6 (C-7), 28.5 (C-25), 28.3 (C-23), 28.3 (C-16), 24.3 (C-15), 21.1 (C-11), 19.4 (C-26), 18.7 (C-27), 16.7 (C-19), 11.8 (C-18)

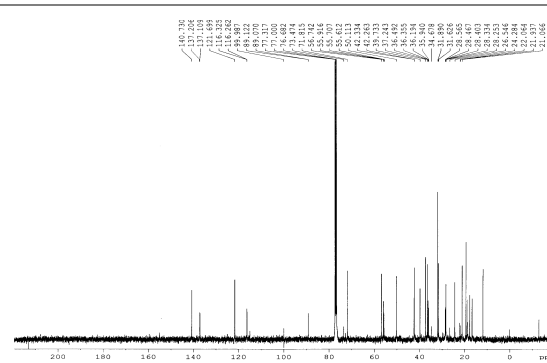


<그림 3-13. Compound 4의 구조>



<그림 3-14.

$^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound 4>

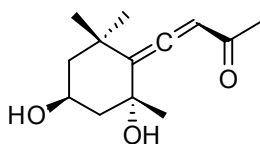


<그림 3-15.

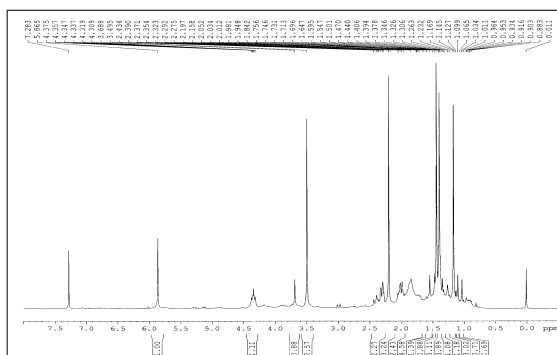
$^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound 4>

③ Identification of compound 5 (grasshopper ketone)

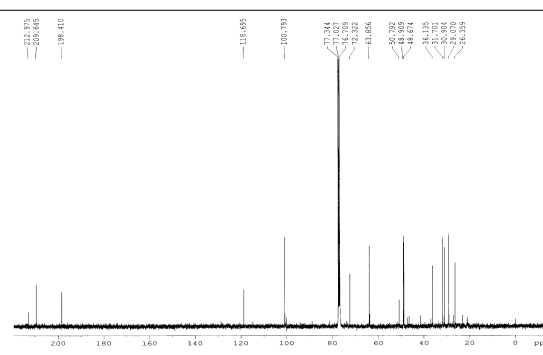
- ESI-MS m/z 247 $[M+Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 5.87 (1H, s, H-8), 4.34 (1H, m, H-3), 2.19 (3H, s, Me-10), 1.44 (3H, s, Me-13), 1.39 (3H, s, Me-11), 1.17 (3H, s, Me-12); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 209.6 (C-9), 198.2 (C-7), 118.7 (C-6), 100.8 (C-8), 72.3 (C-5), 63.9 (C-3), 48.7 (C-4), 48.9 (C-2), 36.1 (C-1), 30.9 (C-12), 31.7 (C-13), 29.1 (C-11), 26.4 (C-10)



<그림 3-16. Compound 5의 구조>



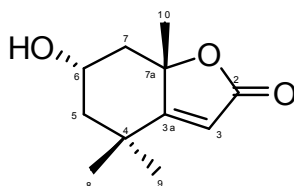
<그림 3-17.
 1H -NMR spectrum of compound 6>



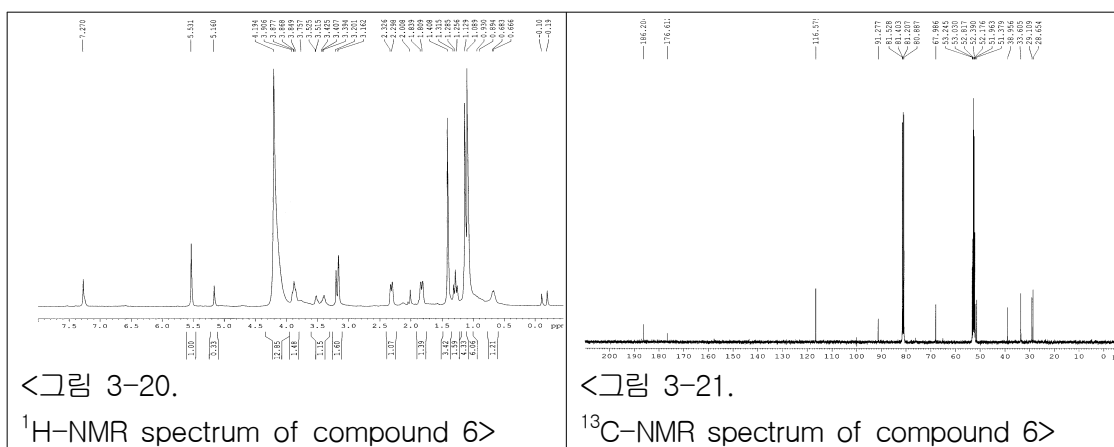
<그림 3-18.
 ^{13}C -NMR spectrum of compound 6>

④ Identification of compound 6 [(+)-epiloliolide]

- ESI-MS m/z 197 $[M+Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 5.70 (1H, s, H-3), 4.35 (1H, brt, $J = 3.5$ Hz, H-6), 2.48 (1H, td, $J = 14.0, 2.4$ Hz, H-5), 2.00 (1H, td, $J = 14.5, 2.4$ Hz, H-7), 1.78 (1H, dd, $J = 14.0, 4.0$ Hz, H-5), 1.80 (3H, s, Me-10), 1.54 (1H, dd, $J = 14.4, 3.6$ Hz, H-7), 1.48 (3H, s, Me-8), 1.29 (3H, s, Me-9); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 182.7 (C-3a), 171.1 (C-2), 112.8 (C-3), 86.9 (C-7a), 66.7 (C-6), 47.3 (C-5), 45.6 (C-7), 36.0 (C-4), 30.7 (C-8), 27.0 (C-10), 26.5 (C-9)

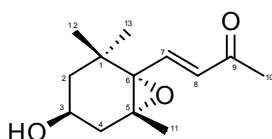


<그림 3-19. Compound 6의 구조>

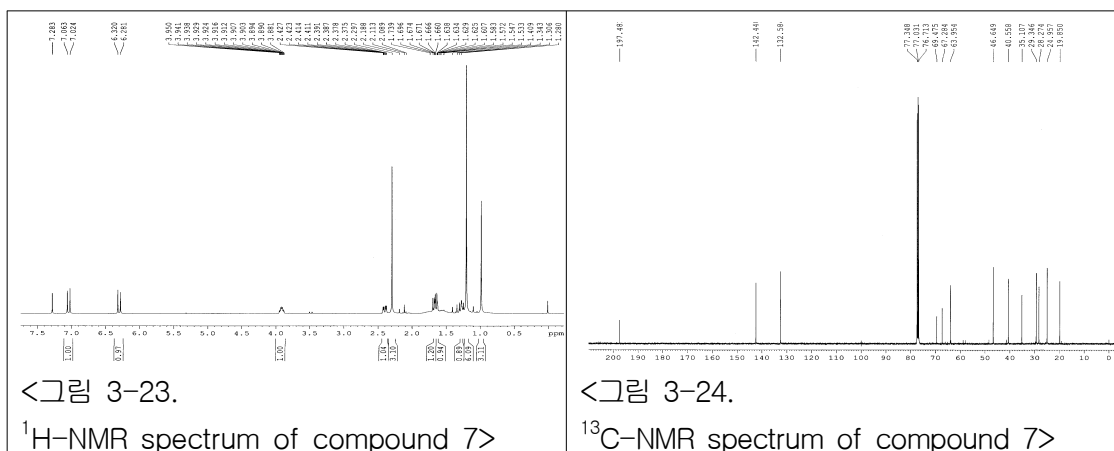


⑤ Identification of compound 7 (5 α ,6 α -epoxy-3 β -hydroxy-7-megastigmen-9-one)

- ESI-MS m/z 247 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 7.04 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7), 6.30 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-8), 3.92 (1H, m, H-3), 2.40 (1H, ddd, J = 14.0, 4.8, 1.2 Hz, H-4), 2.30 (3H, s, Me-10), 1.67 (1H, m, H-4), 1.66 (1H, m, H-2), 1.28 (1H, m, H-2), 1.21 (6H, s, Me-11 and 13), 0.99 (3H, s, Me-12); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 197.5 (C-9), 142.4 (C-7), 132.6 (C-8), 69.5 (C-6), 67.3 (C-5), 64.0 (C-3), 46.6 (C-2), 40.6 (C-4), 35.1 (C-1), 29.3 (C-11), 28.3 (C-10), 25.0 (C-12), 19.9 (C-13)

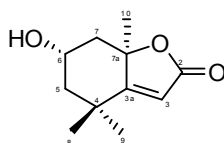


<그림 3-22. Compound 7의 구조>

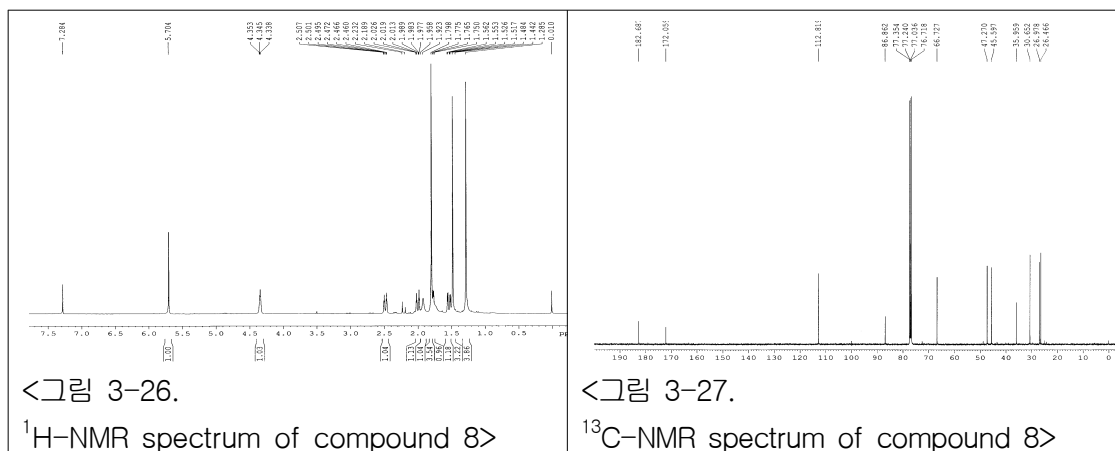


⑥ Identification of compound 8 [(-)-loliolide]

- $[\alpha]_{25}^D -76.0^\circ$ (c 0.2, CHCl_3); ESI-MS m/z 197 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 5.70 (1H, s, H-3), 4.35 (1H, brt, $J = 3.5$ Hz, H-6), 2.48 (1H, td, $J = 14.0, 2.4$ Hz, H-5), 2.00 (1H, td, $J = 14.5, 2.4$ Hz, H-7), 1.78 (1H, dd, $J = 14.0, 4.0$ Hz, H-5), 1.80 (3H, s, Me-10), 1.54 (1H, dd, $J = 14.4, 3.6$ Hz, H-7), 1.48 (3H, s, Me-8), 1.29 (3H, s, Me-9); $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 100 MHz) δ 182.7 (C-3a), 172.1 (C-2), 112.8 (C-3), 86.9 (C-7a), 66.7 (C-6), 47.3 (C-5), 45.6 (C-7), 36.0 (C-4), 30.7 (C-8), 27.0 (C-10), 26.5 (C-9)



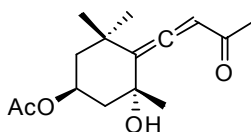
<그림 3-25. Compound 8의 구조>



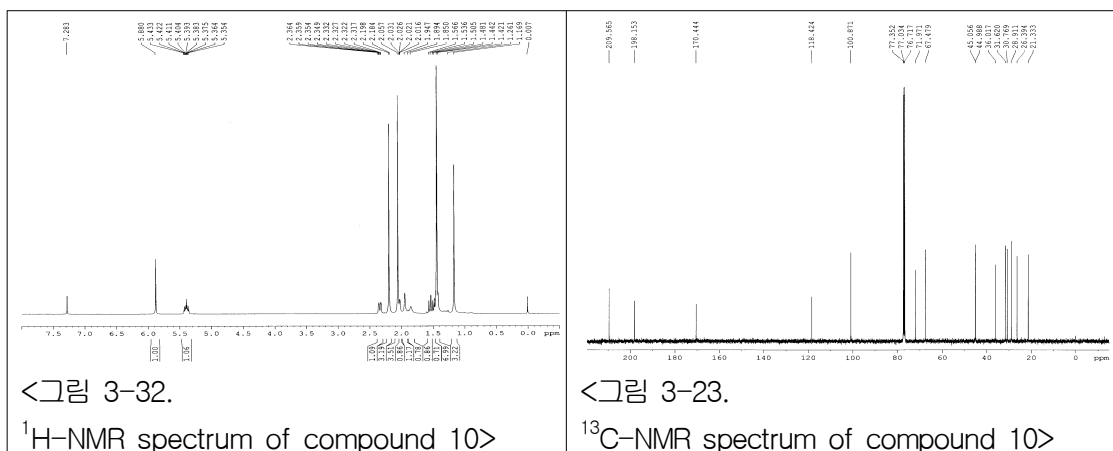
⑧ Identification of compound 10

[(3*S*,5*R*,8*R*)-3-acetoxy-5-hydroxymegastigma-6,7-dien-9-one]

- ESI-MS m/z 289 [M+Na]⁺; ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 5.88 (1H, s, H-8), 5.39 (1H, m, H-3), 2.34 (1H, qd, $J = 12.8, 2.0$ Hz, H-4), 2.20 (3H, s, Me-10), 2.06 (3H, s, OAc), 2.03 (1H, m, H-4), 1.55 (1H, brd, $J = 12.0$ Hz, H-2), 1.48 (1H, m, H-2), 1.44 (6H, s, Me-11 and 13), 1.17 (3H, s, Me-12); ¹³C-NMR (CDCl₃, 100 MHz) δ 209.6 (C-9), 198.2 (C-7), 170.4 (OAc), 118.4 (C-6), 100.9 (C-8), 72.0 (C-5), 67.5 (C-3), 45.1 (C-4), 45.0 (C-2), 36.0 (C-1), 31.6 (C-12), 30.8 (C-13), 28.9 (C-11), 26.4 (C-10), 21.3 (OAc)

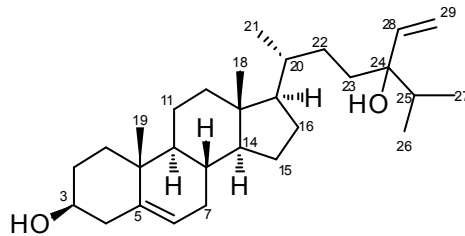


<그림 3-31. Compound 10의 구조>

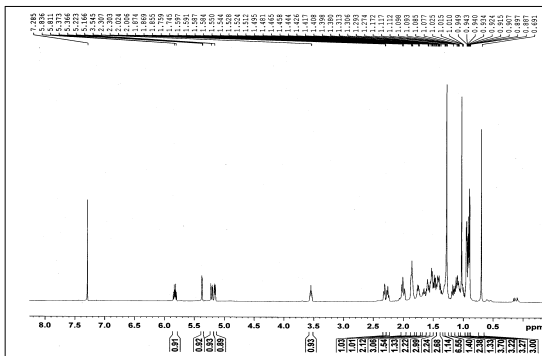


⑨ Identification of compound 13 (Saringosterol)

- White amorphous powder; ESI-MS m/z 451 $[M+Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$, 700 MHz) δ 5.82 (1H, td, $J = 17.5, 10.5$ Hz, H-28), 5.37 (1H, m, H-6), 5.21 (1H, dd, $J = 17.5, 2.4$ Hz, H-29'), 5.16 (1H, dd, $J = 10.5, 2.4$ Hz, H-29), 3.54 (1H, m, H-3), 1.27 (3H, s, H-21), 1.03 (3H, s, H-19), 0.93 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-27), 0.89 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-26), 0.69 (3H, s, H-18); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 175 MHz) δ 142.5 (C-28), 140.8 (C-5), 121.7 (C-6), 112.9 (C-29), 77.7 (C-20), 71.8 (C-3), 56.7 (C-17), 55.8 (C-24), 50.1 (C-9), 42.3 (C-13), 42.3 (C-4), 39.7 (C-22), 37.2 (C-12), 36.1 (C-10), 34.8 (C-1), 34.5 (C-7), 31.9 (C-25), 31.9 (C-2), 31.6 (C-8), 29.1 (C-23), 28.2 (C-16), 24.3 (C-15), 21.1 (C-11), 18.8 (C-19), 17.6 (C-27), 16.5 (C-26), 11.9 (C-18)

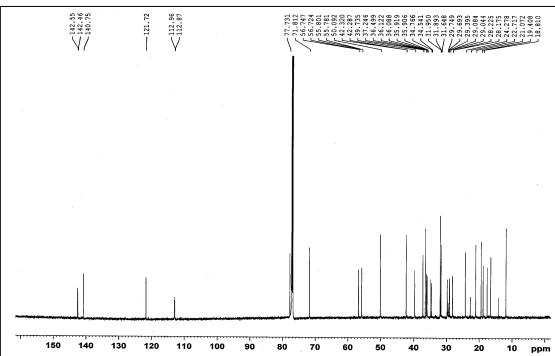


<그림 3-34. Compound 13의 구조>



<그림 3-35.

1H -NMR spectrum of compound 13>

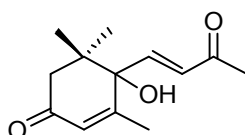


<그림 3-36.

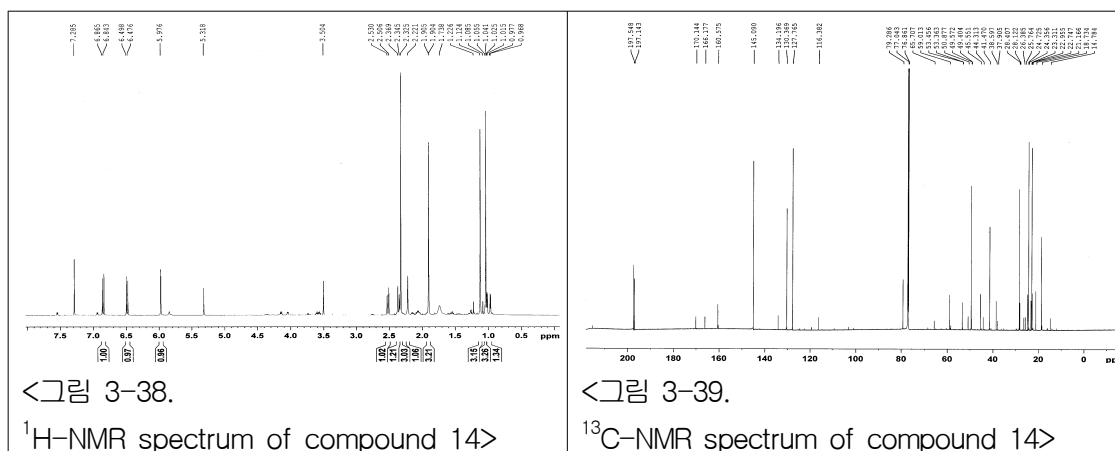
^{13}C -NMR spectrum of compound 13>

⑩ Identification of compound 14 (dehydrovomifoliol)

- ESI-MS m/z 247 $[M+Na]^+$; 1H -NMR ($CDCl_3$, 700 MHz) δ 7.04 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-7), 6.30 (1H, d, $J = 15.6$ Hz, H-8), 3.92 (1H, m, H-3), 2.40 (1H, ddd, $J = 14.0, 4.8, 1.2$ Hz, H-4), 2.30 (3H, s, Me-10), 1.67 (1H, m, H-4), 1.66 (1H, m, H-2), 1.28 (1H, m, H-2), 1.21 (6H, s, Me-11 and 13), 0.99 (3H, s, Me-12); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 175 MHz) δ 197.5 (C-9), 145.1 (C-7), 130.4 (C-8), 79.3 (C-6), 160.5 (C-5), 197.1 (C-3), 49.2 (C-2), 127.8 (C-4), 41.5 (C-1), 24.3 (C-11), 28.4 (C-10), 22.9 (C-12), 18.7 (C-13)

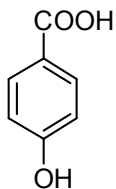


<그림 3-37. Compound 14의 구조>

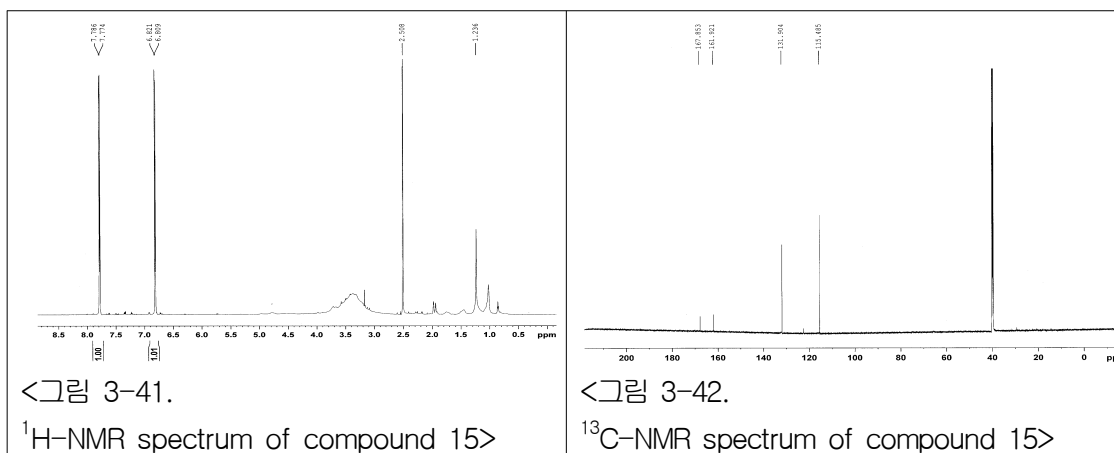


① Identification of compound 15 (4-hydroxybenzoic acid)

- ESI-MS m/z 161 $[M+Na]^+$; 1H -NMR (DMSO- d_6 , 700 MHz) δ 7.78 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-2,6), 6.82 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-3 and 5); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 175 MHz) δ 167.9 (C-7), 161.9 (C-4), 131.9 (C-2,6), 122.8 (C-1), 115.5 (C-3 and 5)

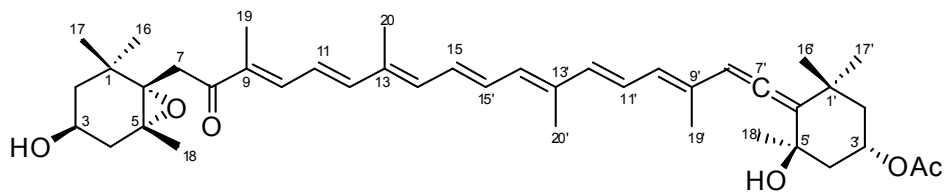


<그림 3-40. Compound 15의 구조>

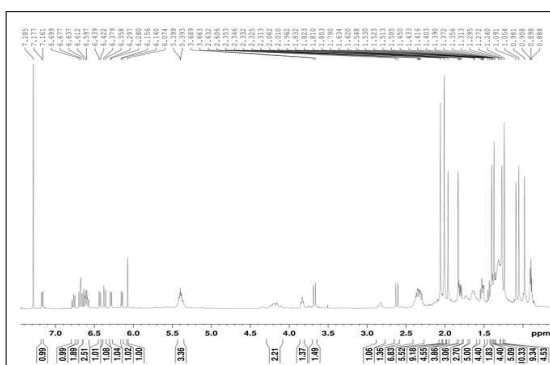


⑫ Identification of compound 17 (fucoxanthin)¹⁾

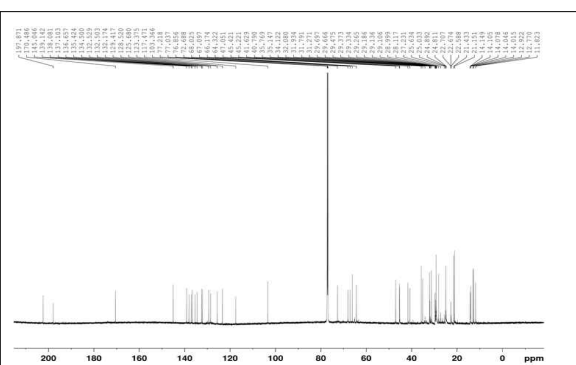
-A colorless gum; ESI-MS (negative mode) m/z 657 $[M-H]^-$; 1H (700 MHz) and ^{13}C (175 MHz) NMR spectroscopic data (표 1).



<그림 3-43. Compound 17의 구조>



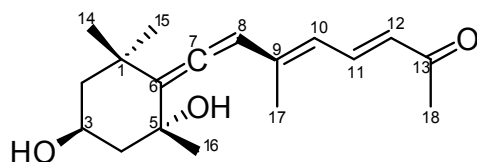
<그림 3-44.
 1H -NMR spectrum of compound 17>



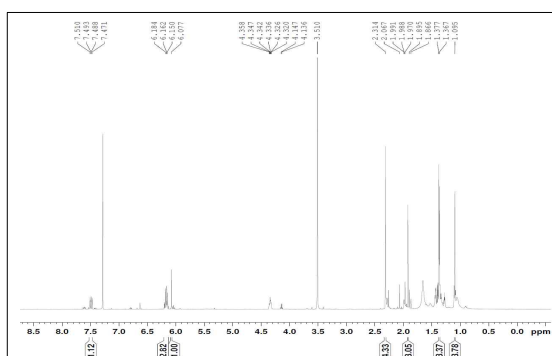
<그림 3-45.
 ^{13}C -NMR spectrum of compound 17>

⑬ Identification of compound 18 (3-Hydroxy-apo-13'-fucoxanthinone)

-A colorless gum; ESI-MS (positive mode) m/z 291 $[M+H]^+$, (negative mode) m/z 289 $[M-H]^-$; 1H (700 MHz) and ^{13}C (175 MHz) NMR spectroscopic data (표 1).

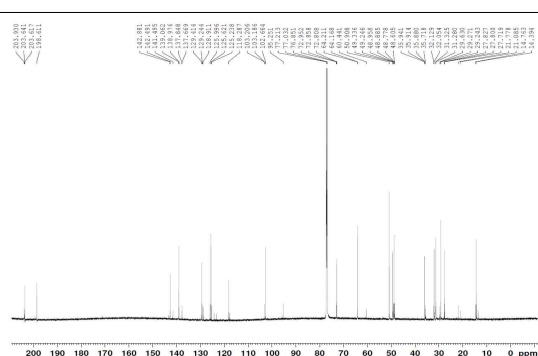


<그림 3-46. Compound 18의 구조>



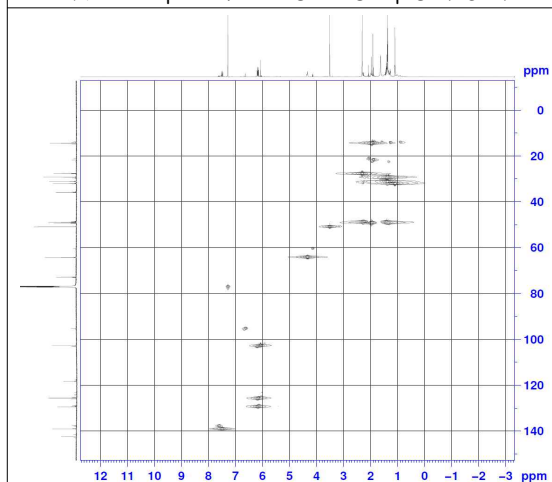
<그림 3-47.

1H -NMR spectrum of compound 18>



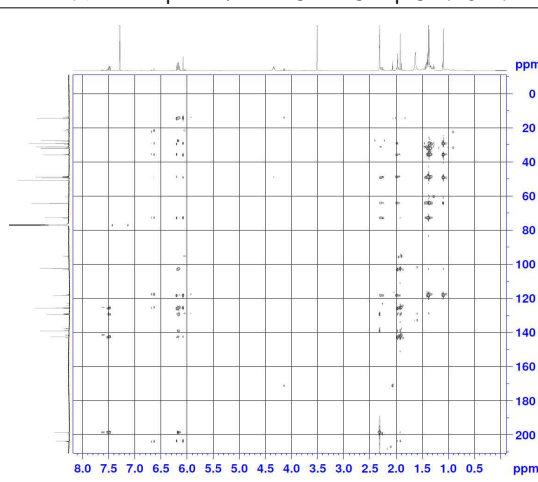
<그림 3-48.

^{13}C -NMR spectrum of compound 18>



<그림 3-49.

HSQC spectrum of compound 18>

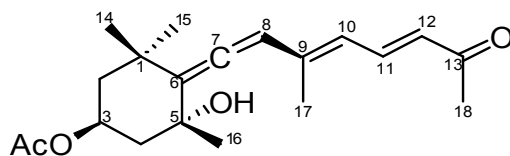


<그림 3-50.

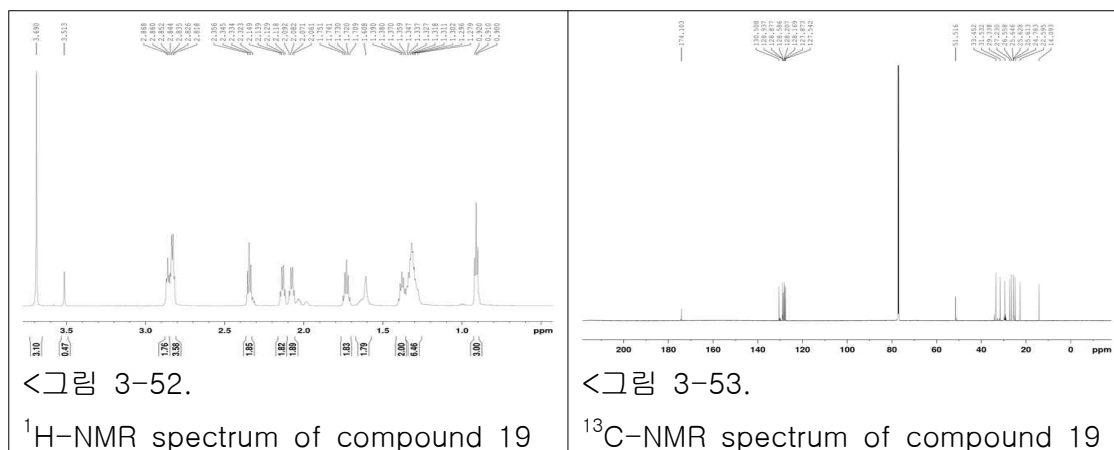
HMBC spectrum of compound 18>

⑭ Identification of compound 19 (Apo-13'-fucoxanthinone)

- A colorless gum; ESI-MS (positive mode) m/z 333 $[M+H]^+$, (negative mode) m/z 331 $[M-H]^-$; 1H (700 MHz) and ^{13}C (175 MHz) NMR spectroscopic data (표 3-5).



<그림 3-51. Compound 19의 구조>



<그림 3-52.

1H -NMR spectrum of compound 19

<그림 3-53.

^{13}C -NMR spectrum of compound 19

<표 3-5. 1H and ^{13}C NMR spectroscopic data for compounds 17 - 19^a>

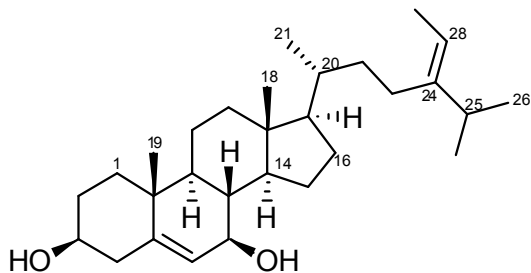
No.	17		18		19	
	δ_H mult., (J Hz)	δ_C	δ_H mult., (J Hz)	δ_C	δ_H mult., (J Hz)	δ_C
1		35.1		35.9		35.9
2	1.51 m, 1.43 m	47.1	1.99 m, 1.34 m	49.3	2.02 m, 1.43 m	45.3
3	3.83 m	64.3	4.33 m	64.2	5.39 m	67.8
4	2.37 m, 1.81 dd (14.0, 9.1)	41.6	2.30 m, 1.40 m	48.9	2.32 m, 1.53 t (11.9)	45.2
5		66.2		72.8		72.6
6		67.1		118. 3		118. 0
7	3.68 d (18.2) 2.62 d (18.2)	40.8		203. 6		203. 6
8		197.	6.08 s	102.	6.10 s	102.
9		134. 5		142. 5		142. 4
10	7.17 d (11.9)	139. 1	6.16 d (11.9)	125. 6	6.16 d (11.9)	125. 8
11	6.60 m	123. 4	7.49 dd (15.4, 11.9)	139. 1	7.49 dd (15.4, 11.9)	139. 0
12	6.68 m	145. 1	6.17 d (15.4)	129. 4	6.18 d (15.4)	129. 4

13		135. 4		198. 6		198. 6
14	6.43 d (11.9)	136. 7	1.10 s	32.1	1.10 s	32.0
15	6.29 d (11.9)	132. 2	1.37 s	29.2	1.42 s	29.2
16	0.98 s	28.1	1.38 s	31.3	1.38 s	31.2
17	1.05 s	25.0	1.92 s	14.4	1.92 s	14.4
18	1.24 s	21.2	2.31 s	27.7	2.32 s	27.8
19	1.96 s	11.8				
20	2.01 s	12.8				
1'		35.8				
2'	2.31 m, 1.52 m	45.2				
3'	5.40 m	68.0				
4'	2.01 m, 1.43 m	45.4				
5'		72.7				
6'		117. 5				
7'		202. 4				
8'	6.07 s	103. 4				
9'		132. 5				
10'	6.15 d (11.9)	128. 5				
11'	6.21 m	125. 7				
12'	6.37 d (15.4)	137. 1				
13'		138. 1				
14'	6.77 t (12.6)	132. 5				
15'	6.66 m	129. 4				
16'	1.37 s	31.3				
17'	1.09 s	32.1				
18'	1.40 s	29.2				
19'	1.83 s	14.0				
20'	2.01 s	12.9				
OAc		170. 5				170. 5
	2.06 s	21.4		2.07 s		21.4

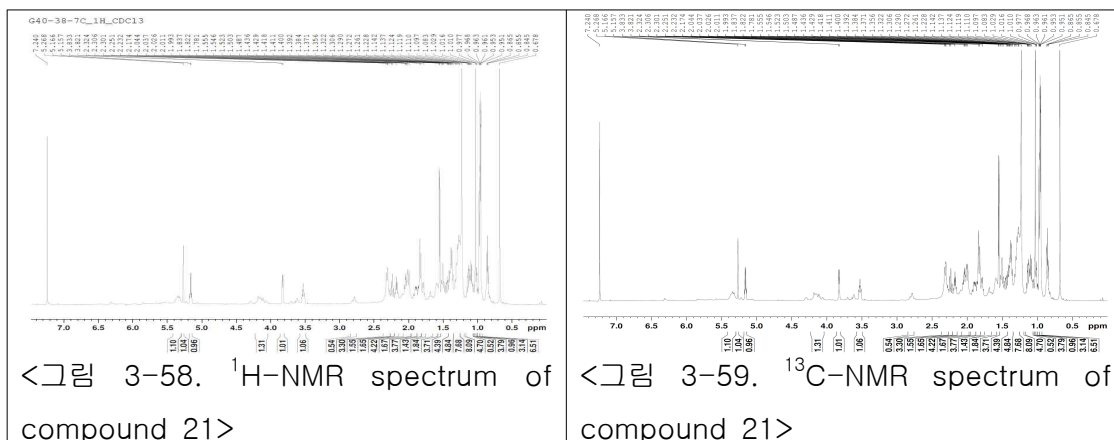
^a Measured at 700 and 175 MHz; obtained in CDCl₃ with TMS as an internal standard. The assignments were based on ¹H-¹H COSY, HSQC, and HMBC experiments.

⑩ Identification of compound 21 (7 β -hydroxyfucosterol)²⁾

- White amorphous powder; ESI-MS (positive mode) m/z 429 [M+H]⁺, (negative mode) m/z 427 [M-H]⁻; ¹H (700 MHz) and ¹³C (175 MHz) NMR spectroscopic data (표 2).

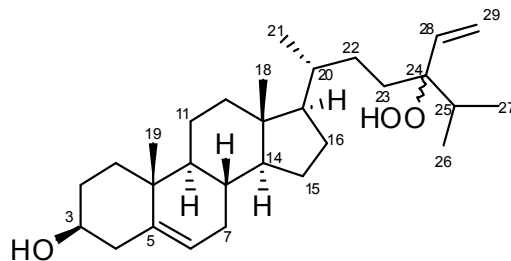


<그림 3-57. Compound 21의 구조>

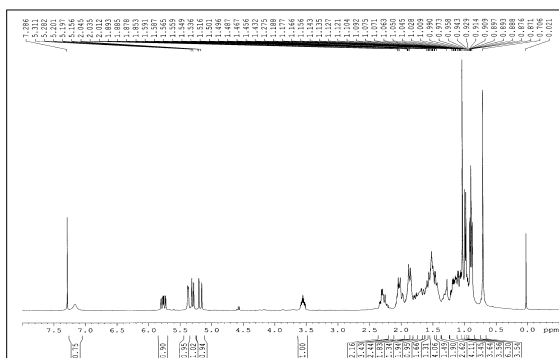


⑰ Identification of compound 22 (24-hydroperoxy-24-vinyl-cholesterol)³⁾

- White amorphous powder; ESI-MS (positive mode) m/z 445 $[M+H]^+$; 1H (700 MHz) and ^{13}C (175 MHz) NMR spectroscopic data (표 3-6).

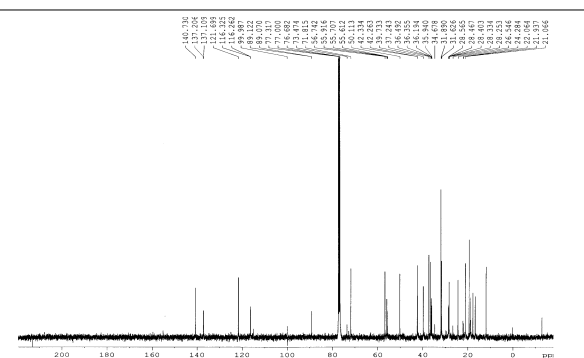


<그림 3-60. Compound 22의 구조>



<그림 3-61.

1H -NMR spectrum of compound 22>



<그림 3-62.

^{13}C -NMR spectrum of compound 22>

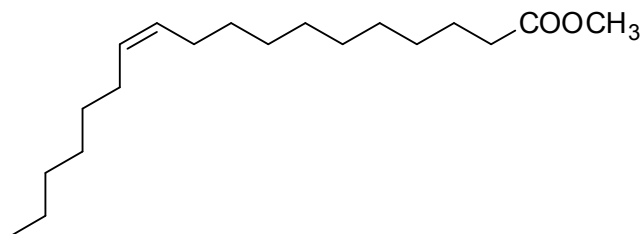
<表 3-6. ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data for compounds 20 – 22^a>

No.	20		21		22	
	δ_{H} mult., (<i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult., (<i>J</i> Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult., (<i>J</i> Hz)	δ_{C}
1	1.87 ^b , 1.13 m	37.0	0.94 ^g	36.9		36.5
2	1.87 ^b , 1.54 m	31.4	1.77 ^d , 1.44 m	31.6		31.9
3	3.88 m	71.4	3.46 m	71.5	3.55 m	71.8
4	2.37 m, 2.32 m	42.0	2.34 m, 2.17 m	41.7		37.2
5		146.		143.5		140.7
		3				
		123.				
6	5.63 brd (4.9)	9	5.20 s	125.4	5.37 m	121.7
7	3.88 brs	65.4	3.76 d (7.7)	73.4		31.6
8		37.5	1.30 ^f	40.9		36.2
9	1.20 m	42.2	0.94 ^g	48.2		50.1
10		37.4	1.76 ^e , 1.30 ^f	36.4		37.2
11		20.7	1.46 m, 1.38 m	21.1		21.1
12	2.04 m, 1.14 ^c	39.1	1.99 m, 1.07 m	39.5		39.7
13		42.2		43.0		42.7
14	1.45 m	49.4	1.07 m	55.9		56.7
15	1.31 m,	28.4	1.72 m, 1.35 m	26.4		24.3
16	1.74 m, 1.14 ^c	24.3	1.83 m	28.6		28.3
17	1.22 m	55.4	0.98 m	55.1		55.9
18	0.72 s	11.6	0.61 s	11.8		11.8
19	1.02 s	18.3	0.96 s	19.2	1.03 s	16.7
20	1.40 m	36.4	1.76 ^e	36.4		35.9
21	1.01 d (7.0)	18.8	0.90 d (7.0)	18.8	0.98 d (6.8)	17.7
22	1.42 m, 1.14 ^c	35.2	1.30 ^f , 1.00 m	35.2		31.6
23	2.09 m, 1.87 ^b	25.5	1.94 m, 1.77 ^d	25.7		28.3
24		147.		146.9		89.1
		0				
25	2.22 septet (7.0)	34.8	2.12 septet (7.0)	34.8		28.5
26	1.00 d (7.0)	22.3	0.89 d (7.0)	22.2	0.91 d (6.8)	19.4
27	0.99 d (7.0)	22.1	0.88 d (7.0)	22.1	0.88 d (6.8)	18.7
		115.				
28	5.21 q (7.0)	6	5.09 q (7.0)	115.6	5.74 ddd (18.0, 11.2, 2.8)	137.2
29	1.59 d (7.0)	13.2	1.48 d (7.0)	13.2	5.30 td (11.5, 1.6) 5.18 dd (18.0, 1.6)	116.3

^a Measured at 700 and 175 MHz; obtained in CDCl_3 with TMS as an internal standard. The assignments were based on ^1H - ^1H COSY, HSQC, and HMBC experiments. ^{b-g} Overlapped with other signals.

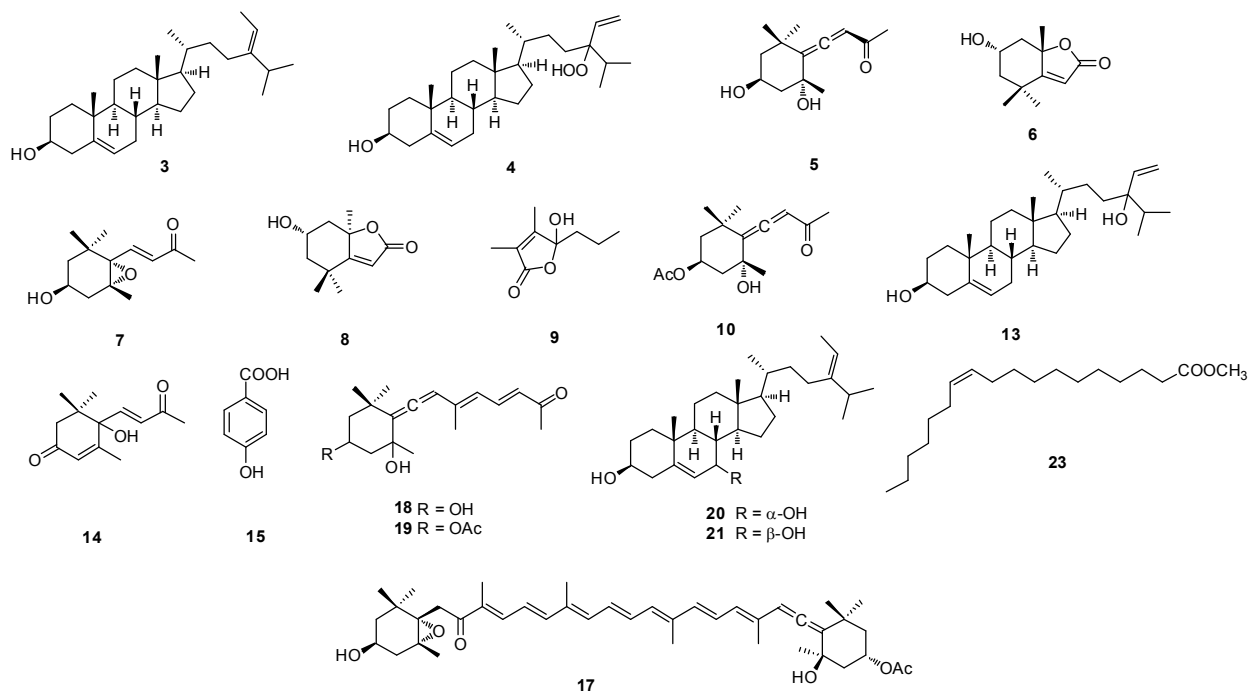
⑱ Identification of compound 23 (Methyl oleate)

- Colorless oil; ESI-MS (positive mode) m/z 297 $[M+H]^+$, (negative mode) m/z 295 $[M-H]^-$; 1H -NMR ($CDCl_3$, 700 MHz) δ 5.36 (2H, m), 3.68 (3H, s, OCH_3), 2.32 (2H, t, $J = 7.7$ Hz), 2.02 (4H, m), 1.64 (2H, m), 0.90 (3H, t, $J = 7.0$ Hz); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 175 MHz) δ 174.4, 130.0, 129.8, 34.1, 31.9, 29.8–29.1, 27.2, 27.17, 25.0, 22.7, 14.1



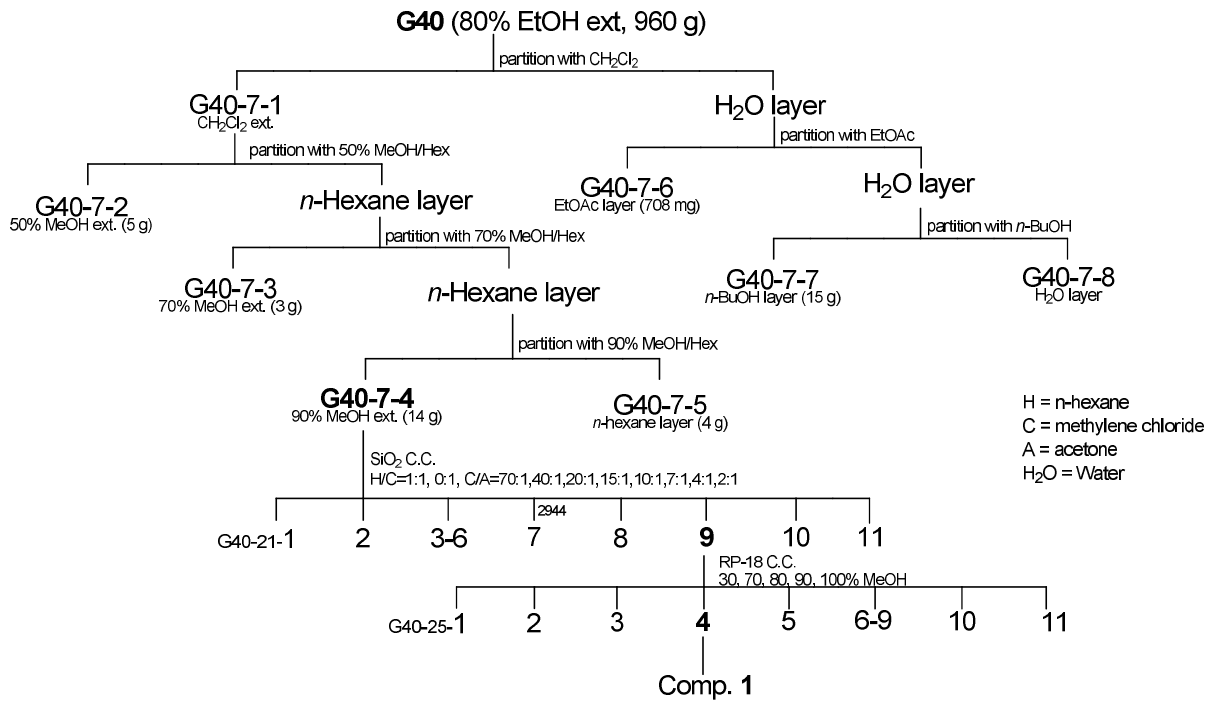
<그림 3-63. Compound 23의 구조>

(나) 분리 정제 및 구조 규명된 화합물



(다) Mixture compound인 Saringosterol 분리

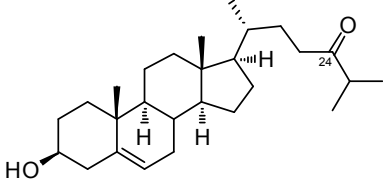
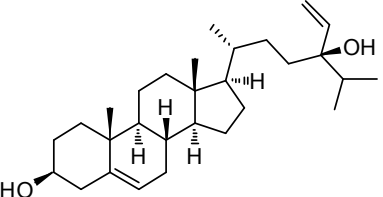
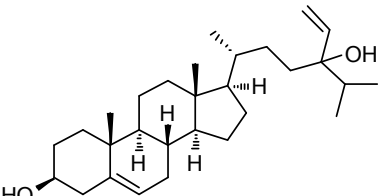
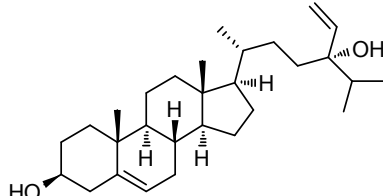
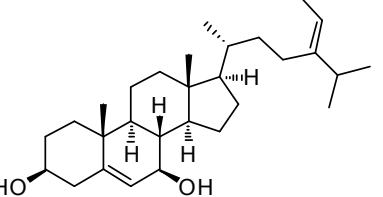
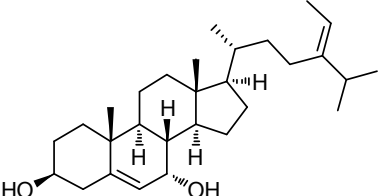
(1) 방법 : 건조 경단구슬모자반 (G40, *Sargassum muticum*)에 80% 에탄올을 가하고 실온에서 2회 반복 추출함. 추출액을 여과한 후에 여액을 회전 감압 농축기를 이용하여 에탄올 추출물 (960g)을 얻었으며, 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 수포화 부탄올로 용매 분획함. 이들 분획물 중에서 디클로로메탄 분획에 대하여 50%, 70%, 90% 메탄올 및 헥산을 이용하여 추가로 용매 분획물을 얻었으며, 이들 용매 분획 중에서 항비만 활성을 나타낸 90% 메탄올층을 감압상태에서 회전 증발시켜 추출물 (14g)을 얻었고, 추출물에 대하여 헥산-디클로로메탄 및 디클로로메탄-아세톤 용매계를 이동상으로 순차적 용리법으로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 11개의 소분획으로 나누었음 (G40-21-1 ~ 11). 분획 G40-21-9에 대하여 역상컬럼 (RP-18) 크로마토그래피를 이동상 메탄올과 물을 기울기 용리법으로 수행하여 11개의 소분획 (G40-25-1 ~ 11)을 얻었으며, G40-25-4 분획에 대하여 이동상 클로로포름과 메탄올을 이용하여 결정화 (crystallization)로부터 화합물 Saringosterol을 분리 정제하였음.



<도식 3-4. Saringosterol의 분획>

(라) Saringosterol에서 분리 정제되어 규명된 화합물
 - 총 6개의 화합물 규명

<표 3-7. 분리 정제 및 구조 규명된 화합물>

구분	화합물명	Structure
Compound 1-1	24-keto-cholesterol	
Compound 1-2	24 <i>S</i> -saringosterol	
Compound 1-3	24 <i>S</i> -sarigosterol	
Compound 1-4	24 <i>R</i> -saringosterol	
Compound 1-5	7β-hydroxyfucosterol	
Compound 1-6	7α-hydroxyfucosterol	

6. 경단구슬모자반의 지표성분 설정

가. 지표성분 : 푸코스테롤 (Fucosterol)

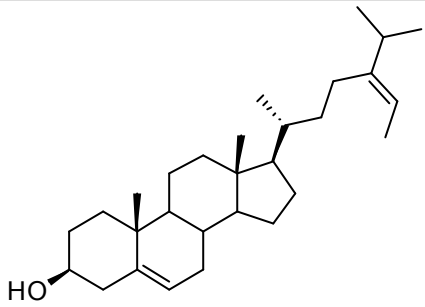
(1) Fucosterol은 갈조류 또는 규조류나 황갈조류에서 발견되는 스테롤화합물로서 성개와 모자반과의 경단구슬모자반, 뜸부기 등에 있는 성분이며, 항산화 효과뿐만 아니라 간 보호에도 효과가 있는 것으로 알려져 있음.

(2) 경단구슬모자반의 주요 구성성분

푸코스테롤(Fucosterol)은 경단구슬모자반의 특정 성분임.

Scientific Name	Major Constituents
<i>Sargassum muticum</i>	Phloretholes, sterols, dicotylphthalate, fucosterol Fucoxanthin, Palmitic acid, Trifuhalol

(3) 푸코스테롤(Fucosterol) 구조

구조	
분자식	C ₂₉ H ₄₈ O
분자량	412.6908

7. 경단구슬모자반 지표성분 함량 분석 : 시험법 Validation

가. 목적

- 경단구슬모자반 추출물의 기준 및 시험방법을 확립하고 이에 대한 시험법 검증

나. 대상

- 경단구슬모자반 추출물, Fucosterol 표준품.

다. 시험법 validation 방법

(1) 밸리데이션 시험항목 대상물질 : 경단구슬모자반 추출물의 주성분인 Fucosterol 함량

(2) 밸리데이션 시험항목 : 기준 및 시험항목에 기재된 시험법 중 함량시험에 대한 직선성, 정확성, 정밀성, 피크의 유지시간 및 면적에 대한 재현성에 대한 시험을 시험하였다.

(3) 시료전처리 조건 및 분석기기조건

함량시험에 대한 시료전처리조건 및 분석기기조건은 자사에서 설정한 기준 및 시험방법에 기술한 조건으로 시험함.

<표 3-8. 분석기기 조건>

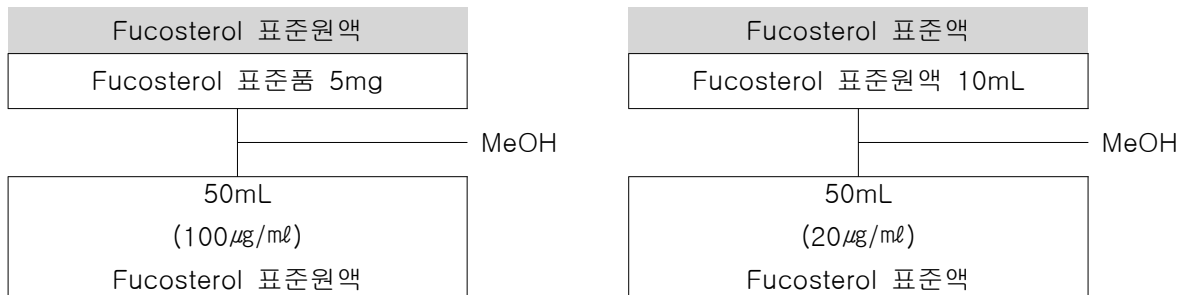
컬럼	Kromasil 100-5C18 (4.6 × 250mm, 5 μ m)
이동상	MeOH
검출기	자외부흡광광도계 (측정파장 : 210nm)
유속	1.0 mL/min
주입량	20 μ l
사용한 HPLC System	Agilent 1100-DAD

라. 밸리데이션 시험방법 및 결과

(1) 특이성 시험

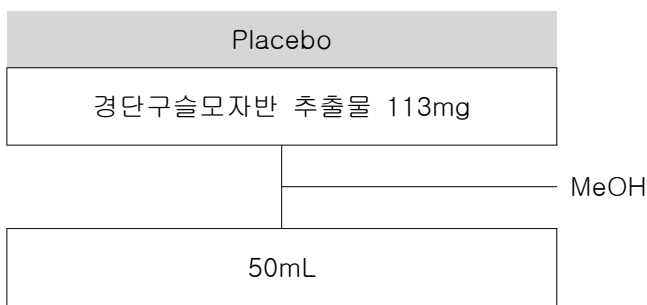
(가) 시험 방법

- ① Blank의 확인 : MeOH이 본 함량시험법에 영향을 미치지 않음을 확인하기 위하여 함량시험법의 기기조건에 따라 시험하여 얻어진 피크의 유지시간이 Fucosterol의 피크와 겹치지 않음을 확인함.
- ② Fucosterol 표준액의 조제 : Fucosterol 표준품 5mg를 정밀히 달아 MeOH로 녹여 정확히 50mL로 함.



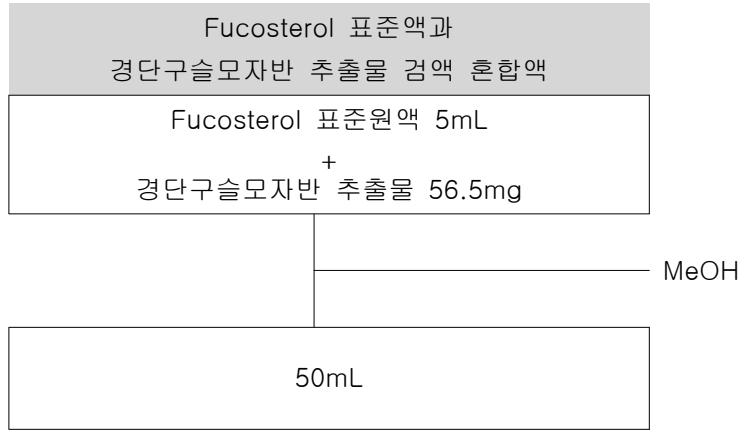
<도식 3-5. Fucosterol 표준액 조제>

- ③ 경단구슬모자반 추출물 (검액의 조제) : 경단구슬모자반 추출물 약 113mg을 정밀하게 취하여 MeOH로 녹여 정확히 50mL로 함. 이 액을 가지고 함량기시험의 기기조건에 따라 시험하여 회수율을 측정함.



<도식 3-6. 경단구슬모자반 추출물 검액 조제>

④ Fucosterol 표준액과 경단구슬모자반 추출물 검액 혼합물에서의 회수율 : 위에서 제조한 Fucosterol 표준원액 5mL과 경단구슬모자반 56.5mg을 취하여 MeOH에 녹여 50 mL로 한다. 이 액을 가지고 함량시험법의 기기조건에 따라 시험하여 회수율을 측정함.



<도식 3-7. Fucosterol 표준액과 경단구슬모자반 추출물 검액 혼합액 조제>

(나) 시험 결과

Fucosterol은 완전히 분리되며 피크 유지시간이 17.049분이고 Blank 에서는 Fucosterol과 겹치는 피크가 없었으며 Fucosterol 표준액+경단구슬모자반 추출물 시험결과 그의 회수율은 102.21% 로서 양호한 결과를 얻었음. 위의 결과를 종합 했을 때 본 분석방법은 제품에서 Fucosterol을 측정하는데 있어서 특이성이 있음을 확인 할 수 있었음.

<표 3-9. 특이성 시험결과>

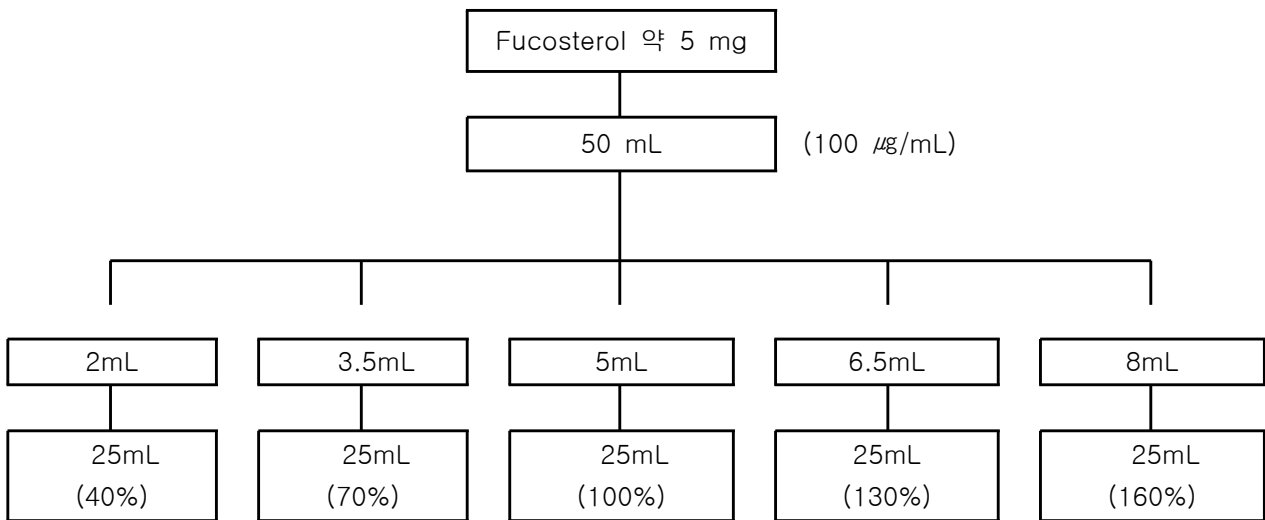
특이성시험결과	RT	피크면적	회수율(%)
Blank (MeOH)	-	-	-
Fucosterol 표준액	17.049	199.07118	-
경단구슬모자반 추출물	17.033	181.63600	0.79
Fucosterol 표준액 + 경단구슬모자반 추출물	17.073	193.24777	102.21

(2) 직선성 시험 (STD)

(가) 경단구슬모자반 추출물 중 Fucosterol 함량시험

① Fucosterol 표준품을 가지고 함량시험농도(20 μ g/mL)의 40 ~ 160% 범위에서의 직선성을 확인함.

② 직선성 시험용액의 조제 : Fucosterol 표준품 약 5mg을 정확히 취하여 MeOH을 넣어 50mL로 하고 (100 μ g/mL), 이를 각각 2.0mL, 3.5mL, 5.0mL, 6.5mL, 8.0mL를 정확히 취한 다음 여기에 MeOH을 넣어 정확히 25mL로 함. 이는 각각 함량시험에서 기준농도의 40%, 70%, 100%, 130%, 160%에 해당하는 농도임.



<도식 3-8. 직선성 시험용액 조제>

☞ 각 표준품의 실제 취한 양 (표준품의 순도 : 92.6%)

- Group 1 Fucosterol : 5.3 mg × 순도 92.6 % = 4.9078 mg
- Group 2 Fucosterol : 5.3 mg × 순도 92.6 % = 4.9078 mg
- Group 3 Fucosterol : 5.3 mg × 순도 92.6 % = 4.9078 mg

(나) 직선성시험 (STD) 결과

(나-1) Group 1의 직선성시험결과 : Fucosterol을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음.

① 피크면적 및 검량선식

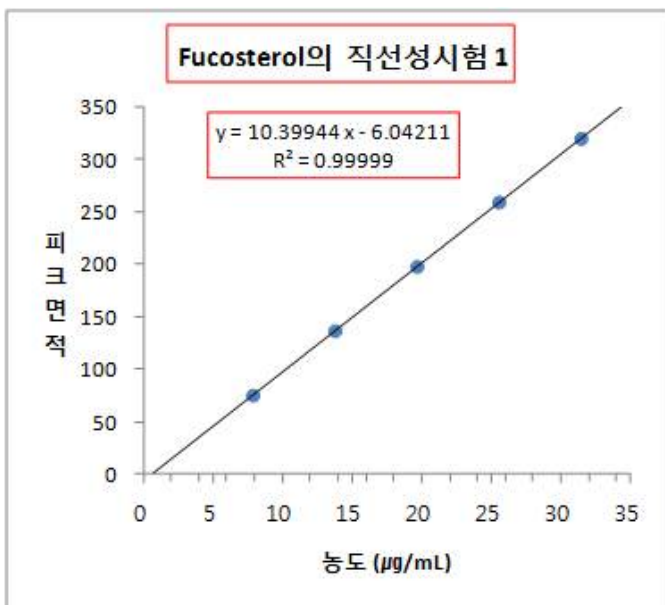
<표 3-10. Fucosterol 피크면적 및 검량선식 group 1>

Group 1	Fucosterol		
	mL	농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)	피크면적
Cal 1 - 1	2.0	7.85	75.43282
Cal 1 - 2	3.5	13.74	136.96162
Cal 1 - 3	5.0	19.63	198.20190
Cal 1 - 4	6.5	25.52	259.63348
Cal 1 - 5	8.0	31.41	320.32715
기울기	10.39944		
y 절편	-6.04211		
R^2	0.99999		

검량선식

$$\text{Group 1 } y = 10.39944 x - 6.04211 \quad (R^2 = 0.99999)$$

② 검량선 그래프



<그림 3-64. Fucosterol 검량선 그래프 group 1>

(나-2) Group 2의 직선성시험결과 : Fucosterol을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음.

① 피크면적 및 검량선식

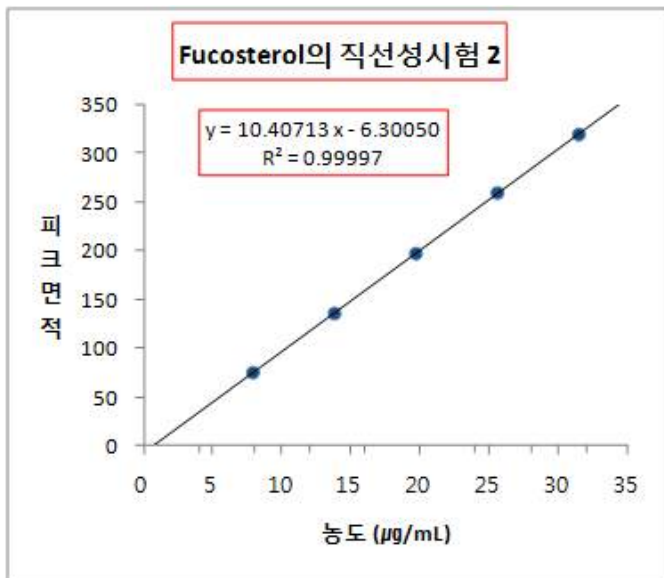
<표 3-11. Fucosterol 피크면적 및 검량선식 group 2>

Group 1	Fucosterol		
	mL	농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)	피크면적
Cal 1 - 1	2.0	7.85	75.57434
Cal 1 - 2	3.5	13.74	136.33540
Cal 1 - 3	5.0	19.63	197.83160
Cal 1 - 4	6.5	25.52	260.15878
Cal 1 - 5	8.0	31.41	320.11920
기울기	10.40713		
y 절편	-6.30050		
R ²	0.99997		

검량선식

Group 2 $y = 10.40713 x - 6.30050$ ($R^2 = 0.99997$)

② 검량선 그래프



<그림 3-65. Fucosterol 검량선 그래프 group 2>

(나-3) Group 3의 직선성시험결과 : Fucosterol을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R²)은 0.99 이상으로 직선성이 있음.

① 피크면적 및 검량선식

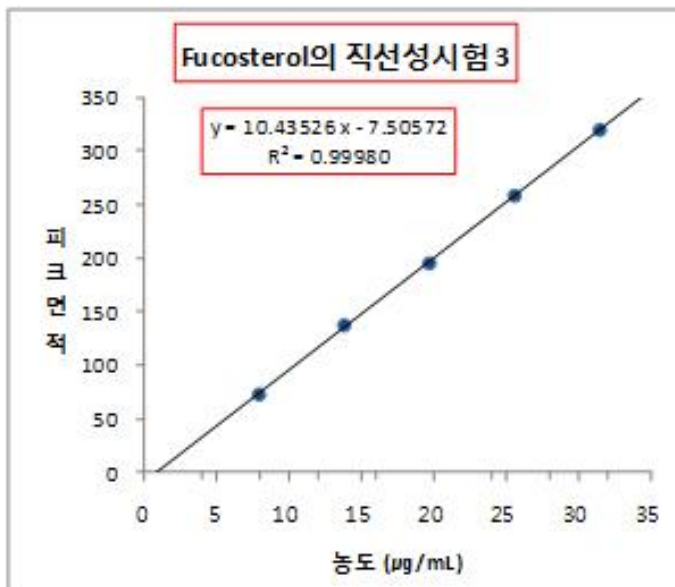
<표 3-12. Fucosterol 피크면적 및 검량선식 group 3>

Group 1	Fucosterol		
	mL	농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)	피크면적
Cal 1 - 1	2.0	7.85	73.50669
Cal 1 - 2	3.5	13.74	138.06985
Cal 1 - 3	5.0	19.63	195.90820
Cal 1 - 4	6.5	25.52	258.88654
Cal 1 - 5	8.0	31.41	320.38330
기울기	10.43526		
y 절편	-7.50572		
R ²	0.99980		

검량선식

Group 3 $y = 10.43526 x - 7.50572$ ($R^2 = 0.99980$)

② 검량선 그래프



<그림 3-66. Fucosterol 검량선 그래프 group 3>

(라) Fucosterol의 직선성시험 종합결과

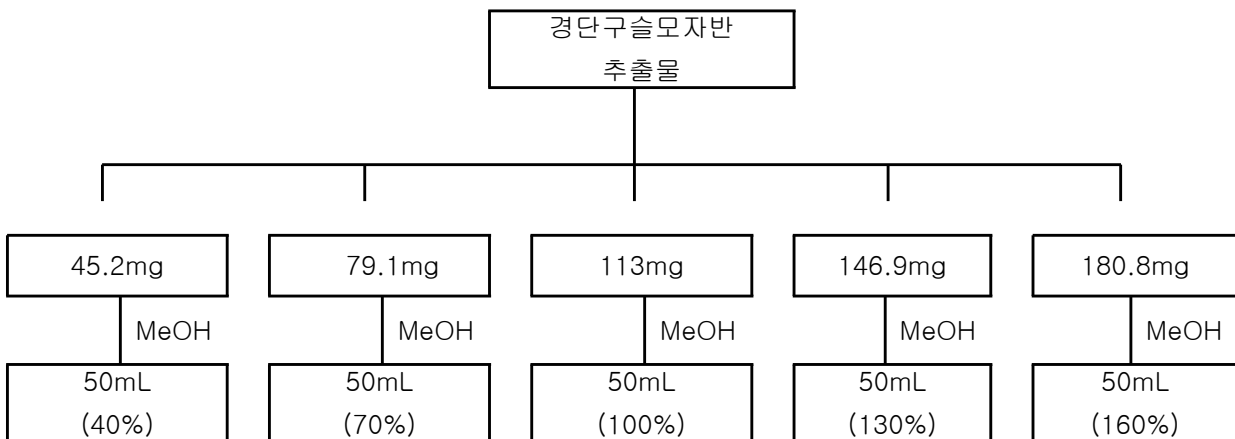
<표 3-13. 경단구슬모자반 추출물 직선성시험 종합결과>

직선성시험 종합결과	Fucosterol		
	기울기	y 절편	R ²
직선성시험 1	10.39944	-6.04211	0.99999
직선성시험 2	10.40713	-6.30050	0.99997
직선성시험 3	10.43526	-7.50572	0.99980
평균	10.41394	-6.61611	0.99992
표준편차	0.018856	0.78118	0.00011
종합 검량선	$y = 10.41394 x - 6.61611 (R^2 = 0.99992)$		

(3) 직선성 시험 (SA)

(가) 경단구슬모자반 추출물 중 Fucosterol 함량시험

- ① 경단구슬모자반 추출물을 가지고 함량시험농도의 40 ~ 160% 범위에서의 직선성을 확인함.
- ② 직선성 시험용액의 조제 : 경단구슬모자반 추출물을 각각 약 45.2mg, 79.1mg, 113mg, 146.9mg, 180.8mg를 정확히 취한 다음 메탄올에 녹여 50mL로 함. 이는 각각 함량시험에서 기준농도의 40%, 70%, 100%, 130%, 160%에 해당하는 농도임.



<도식 3-9. 경단구슬모자반 추출물 직선성 시험용액 조제>

☞ 각 경단구슬모자반 추출물의 실제 취한 양

Group 1 경단구슬모자반 추출물 : 45.6mg, 79.1mg, 112.6mg, 146.9mg, 181.1mg

Group 2 경단구슬모자반 추출물 : 47.0mg, 80.0mg, 114.5mg, 150.3mg, 181.9mg

Group 3 경단구슬모자반 추출물 : 45.5mg, 81.0mg, 114.2mg, 146.6mg, 188.4mg

(나) 직선성시험 (SA) 결과

(나-1) Group 1의 직선성시험결과 : 경단구슬모자반 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음.

① 피크면적 및 검량선식

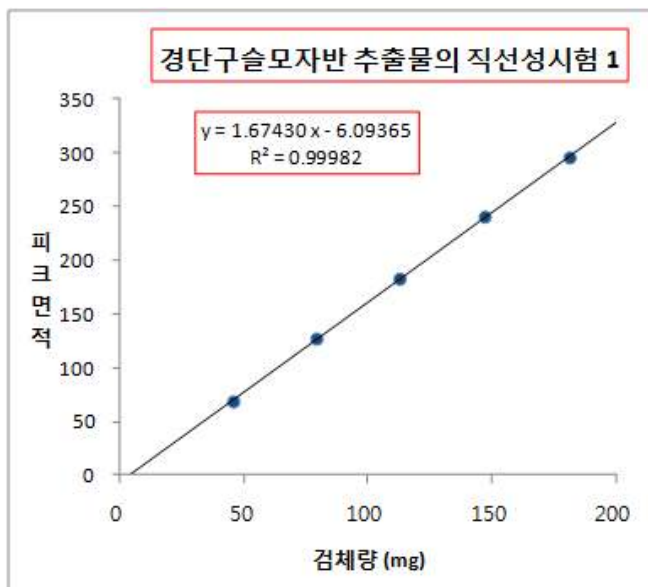
<표 3-14. 경단구슬모자반 추출물 직선성 시험결과 group 1>

Group 1	경단구슬모자반 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	45.6	68.94000
Cal 1 - 2	79.1	127.32918
Cal 1 - 3	112.6	183.09711
Cal 1 - 4	146.9	240.79781
Cal 1 - 5	181.1	295.84940
기울기	1.67430	
y 절편	-6.09365	
R^2	0.99982	

검량선식

Group 1 $y = 1.67430 x - 6.09365$ ($R^2 = 0.99982$)

② 검량선 그래프



<그림 3-67. 경단구슬모자반 추출물 직선성 시험 그래프 group 1>

(나-2) Group 2의 직선성시험결과 : 경단구슬모자반 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음.

① 피크면적 및 검량선식

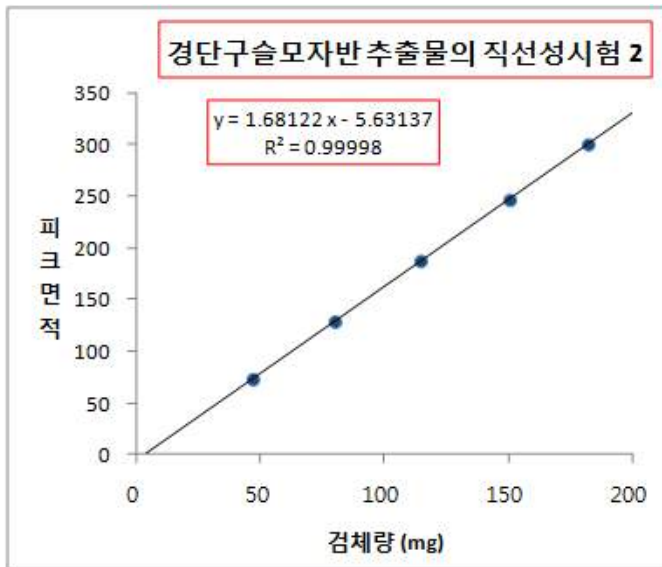
<표 3-15. 경단구슬모자반 추출물 직선성 시험결과 group 2>

Group 2	경단구슬모자반 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	47.0	73.21284
Cal 1 - 2	80.0	128.85690
Cal 1 - 3	114.5	187.47804
Cal 1 - 4	150.3	246.52292
Cal 1 - 5	181.9	300.28717
기울기	1.68122	
y 절편	-5.63137	
R^2	0.99998	

검량선식

Group 2 $y = 1.68122 x - 5.63137$ ($R^2 = 0.99998$)

② 검량선 그래프



<그림 3-68. 경단구슬모자반 추출물 직선성 시험 그래프 group 2>

(나-3) Group 3의 직선성시험결과 : 경단구슬모자반 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음.

음.

① 피크면적 및 검량선식

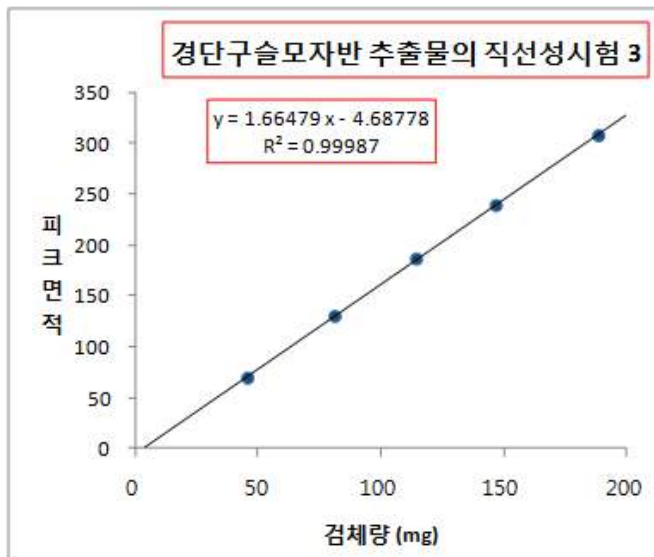
<표 3-16. 경단구슬모자반 추출물 직선성 시험결과 group 3>

Group 3	경단구슬모자반 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	45.5	69.94803
Cal 1 - 2	81.0	130.56750
Cal 1 - 3	114.2	186.92075
Cal 1 - 4	146.6	239.48500
Cal 1 - 5	188.1	308.06192
기울기	1.66479	
y 절편	-4.68778	
R ²	0.99987	

검량선식

$$\text{Group 3 } y = 1.66479 x - 4.68778 \quad (R^2 = 0.99987)$$

② 검량선 그래프



<그림 3-69. 경단구슬모자반 추출물 직선성 시험 그래프 group 3>

(다) 경단구슬모자반 추출물의 직선성 시험 종합결과

<표 3-17. 경단구슬모자반 추출물 직선성시험 종합결과>

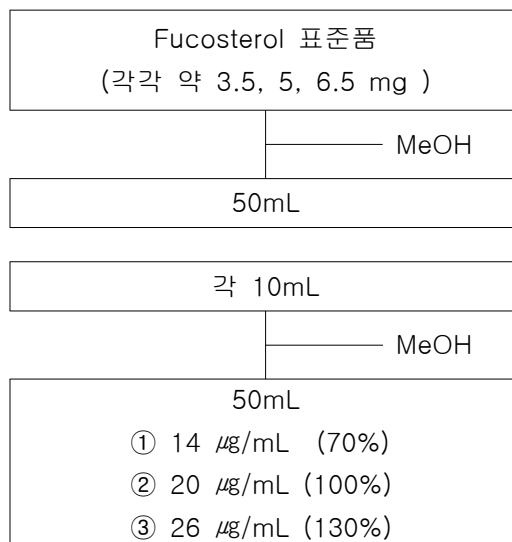
직선성시험 종합결과	경단구슬모자반 추출물		
	기울기	y 절편	R ²
직선성시험 1	1.67430	-6.09365	0.99982
직선성시험 2	1.68122	-5.63137	0.99998
직선성시험 3	1.66479	-4.68778	0.99987
평균	1.67344	-5.47093	0.99989
표준편차	0.008246	0.71654	0.00008
종합 검량선	$y = 1.67344 x - 5.47093 (R^2 = 0.99989)$		

(4) 정확성 및 정밀성 시험

(가) 경단구슬모자반 추출물 중 Fucosterol의 정확성 및 정밀성

① Fucosterol 표준품을 가지고 기준 및 시험방법에 기재된 방법으로 기준농도의 70%, 100%, 130%에 해당하는 농도의 용액을 조제하고 동일한 HPLC조건으로 6회 반복 주입하여 시험하여 얻은 피크면적 및 피크의 유지시간을 가지고 유지시간 및 피크면적에 대한 재현성을 확인하고 정밀성을 확인함. 또한 이 시험에서 얻은 피크면적을 위의 직선성시험 결과에서 얻은 회귀방정식에 대입하여 실제의 농도를 계산하였으며 이를 이론농도에 대한 회수율을 구하여 위에서 얻은 회귀방정식의 정확성을 확인하였음.

② 정확성 및 정밀성 시험용액 조제



<도식 3-10. 경단구슬모자반 정확성 및 정밀성 시험용액 조제>

③ 시험결과에 대한 평가방법

- 위의 시험방법의 “2) 정확성, 정밀성, 피크의 유지시간 및 면적에 대한 재현성시험을 위한 시험액”을 가지고 HPLC에 6회 반복주입하여 얻어진 피크의 유지시간 및 면적을 가지고 계산하였을 때 상대표준편차는 2.0%이하 이어야 하며, 회수율은 95.0% - 105.0%이어야 함.

(나) 경단구슬모자반 추출물 중 Fucosterol의 정확, 정밀성시험 결과

Fucosterol의 회수율이 95.0 ~ 105.0 % 이내의 아주 양호한 결과를 얻었고 회수율의 상대표준편차가 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정확성이 있음

① 피크면적을 위의 검량선식에 대입하여 얻어진 Fucosterol의 정확성과 회수율 (%)

<표 3-18. 경단구슬모자반 정확, 정밀성 결과 1-3>

	Fucosterol					
	취한 양 (mg)	이론농도 (µg/mL)	피크면적	실제농도 (µg/mL)	회수율 (%)	
정확성 - 1 (70%)	3.7	13.70	142.35092	14.3046	104.38	
			141.78622	14.2504	103.98	
			141.56450	14.2291	103.83	
			142.88570	14.3559	104.75	
			142.12437	14.2828	104.22	
			141.32999	14.2065	103.66	
					평균	104.14
					표준편차	0.40
					RSD (%)	0.38

	Fucosterol					
	취한 양 (mg)	이론농도 (µg/mL)	피크면적	실제농도 (µg/mL)	회수율 (%)	
정확성 - 2 (100%)	5.0	18.52	193.85403	19.2502	103.94	
			192.77599	19.1467	103.38	
			192.98732	19.1669	103.49	
			192.32304	19.1032	103.15	
			191.96307	19.0686	102.96	
			192.03032	19.0750	103.00	
					평균	103.32
					표준편차	0.37
					RSD (%)	0.36

	Fucosterol					
	취한 양 (mg)	이론농도 (µg/mL)	피크면적	실제농도 (µg/mL)	회수율 (%)	
정확성 - 3 (130%)	6.6	24.45	255.85704	25.2040	103.10	
			255.15404	25.1365	102.82	
			257.73013	25.3839	103.83	
			256.60208	25.2756	103.39	
			257.68890	25.3799	103.82	
			258.49329	25.4572	104.13	
					평균	103.52
					표준편차	0.50
					RSD (%)	0.48

② Fucosterol의 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성 결과 : Fucosterol 피크면적의 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로서 시험방법은 정밀성과 재현성이 있음.

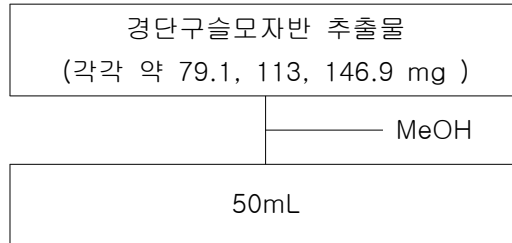
<표 3-19. Fucosterol 피크 면적에 대한 정밀성 및 재현성>

시험액의 농도	Fucosterol					
	70%		100%		130%	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area
1회	16.998	142.35092	17.003	193.85403	17.011	255.85704
2회	17.002	141.78622	17.007	192.77599	17.010	255.15404
3회	17.007	141.56450	17.009	192.98732	17.068	257.73013
4회	17.001	142.88570	17.010	192.32304	17.062	256.60208
5회	17.002	142.12437	17.014	191.96307	17.064	257.68890
6회	17.004	141.32999	17.011	192.03032	17.067	258.49329
평균	17.002	142.00695	17.009	192.65563	17.047	256.92091
표준편차	0.003	0.57	0.004	0.71	0.028	1.27
RSD (%)	0.02	0.40	0.02	0.37	0.17	0.49
시험기준 RSD (%)	2.0 % 이하					

(다) 경단구슬모자반 추출물의 정확성 및 정밀성 시험

① 경단구슬모자반 추출물을 가지고 기준 및 시험방법에 기재된 방법으로 기준농도의 70%, 100%, 130%에 해당하는 농도의 용액을 조제하고 동일한 HPLC조건으로 6회 반복 주입하여 시험하여 얻은 피크면적 및 피크의 유지시간을 가지고 유지시간 및 피크면적에 대한 재현성을 확인하고 정밀성을 확인하였다.

② 정확성 및 정밀성 시험용액 조제



<도식 3-11. 경단구슬모자반 추출물 정확성 및 정밀성 시험용액 조제>

③ 시험결과에 대한 평가방법

- 위의 시험방법의 “2) 정확성, 정밀성, 피크의 유지시간 및 면적에 대한 재현성시험을 위한 시험액”을 가지고 HPLC에 6회 반복주입하여 얻어진 피크의 유지시간 및 면적을 가지고 계산하였을 때 상대표준편차는 2.0%이하 이어야 하며, 회수율은 95.0% - 105.0%이어야 함.

(라) 경단구슬모자반 추출물의 정확성 및 정밀성시험 결과

경단구슬모자반 추출물의 회수율이 95.0 ~ 105.0 % 이내의 아주 양호한 결과를 얻었고 회수율의 상대표준편차가 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정확성이 있음

① 피크면적을 위의 검량선식에 대입하여 얻어진 경단구슬모자반 추출물의 정확성과 회수율 (%)

<표 3-20. 경단구슬모자반 추출물 정확, 정밀성 시험결과 1-3>

	경단구슬모자반 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정확성 - 1 (70%)	79.1	126.64857	78.9510	99.81
		126.19419	78.6794	99.47
		124.82214	77.8595	98.43
		126.16602	78.6626	99.45
		126.92702	79.1174	100.02
		126.58130	78.9108	99.76
			평균	99.49
			표준편차	0.56
			RSD (%)	0.57

	경단구슬모자반 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정확성 - 2 (100%)	112.6	183.10977	112.6906	100.08
		183.10812	112.6896	100.08
		183.10913	112.6902	100.08
		183.05956	112.6606	100.05
		182.26566	112.1862	99.63
		181.78645	111.8998	99.38
	평균			99.88
	표준편차			0.30
RSD (%)			0.30	

	경단구슬모자반 추출물			
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)
정확성 - 3 (130%)	146.9	239.67029	146.4896	99.72
		238.52347	145.8043	99.25
		240.78317	147.1547	100.17
		240.41707	146.9359	100.02
		240.01927	146.6982	99.86
		238.92303	146.0431	99.42
	평균			99.74
	표준편차			0.35
RSD (%)			0.35	

② 경단구슬모자반 추출물의 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성 결과

경단구슬모자반 추출물 피크면적의 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정밀성과 재현성이 있음.

<표 3-21. 경단구슬모자반 추출물 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성>

시험액의 농도	경단구슬모자반 추출물					
	70%		100%		130%	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area
1회	16.990	126.64857	17.013	183.10977	16.970	239.67029
2회	16.995	126.19419	16.993	183.10812	16.974	238.52347
3회	16.998	124.82214	16.990	183.10913	16.978	240.78317
4회	16.997	126.16602	16.983	183.05956	16.973	240.41707
5회	17.005	126.92702	16.976	182.26566	16.977	240.01927
6회	16.995	126.58130	16.981	181.78645	16.972	238.92303
평균	16.997	126.22321	16.989	182.73978	16.974	239.72272
표준편차	0.005	0.74	0.013	0.57	0.003	0.87
RSD (%)	0.03	0.59	0.08	0.31	0.02	0.36
시험기준 RSD (%)	2.0 % 이하					

(5) 검출한계 (Detection Limit, DL) 및 정량한계 (Quantitation Limit, QL)

- Fucosterol의 직선성 시험용액 3개의 Group을 가지고 각 Group에 대한 검량선을 작성하여 각각의 검량선의 기울기와 y 절편을 구함.
- 이들 각각 3개의 검량선에서 기울기의 평균값과 y 절편에 대한 표준편차를 구하여 ICH에서 규정한대로 아래의 식으로 검출한계 및 정량한계를 계산함.

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times y \text{ 절편의 표준편차}}{\text{검량선 기울기의 평균값}}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times y \text{ 절편의 표준편차}}{\text{검량선 기울기의 평균값}}$$

(가) Fucosterol의 검량선

<표 3-22. Fucosterol의 검량선>

① Group 1	$y = 10.39944 x - 6.04211 \quad (R^2=0.99999)$
② Group 2	$y = 10.40713 x - 6.30050 \quad (R^2=0.99997)$
③ Group 3	$y = 10.43526 x - 7.50572 \quad (R^2=0.99980)$
종합 검량선	$y = 10.41394 x - 6.61611 \quad (R^2=0.99992)$
검량선 기울기의 평균값	10.41394
종합 검량선의 y 절편의 표준편차	0.78118

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times 0.78118}{10.41394} = 0.75 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times 0.78118}{10.41394} = 0.25 \mu\text{g/mL}$$

(나) 경단구슬모자반 추출물의 검량선

<표 3-23. 경단구슬모자반 추출물의 검량선>

① Group 1	$y = 1.67430 x - 6.09365 \quad (R^2=0.99982)$
② Group 2	$y = 1.68122 x - 5.63137 \quad (R^2=0.99998)$
③ Group 3	$y = 1.66479 x - 4.68778 \quad (R^2=0.99987)$
종합 검량선	$y = 1.67344 x - 5.47093 \quad (R^2=0.99989)$
검량선 기울기의 평균값	1.67344
종합 검량선의 y 절편의 표준편차	0.71654

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times 0.71654}{1.67344} = 4.28 \text{ mg/50mL}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times 0.71654}{1.67344} = 1.41 \text{ mg/50mL}$$

(다) 범위 : 경단구슬모자반 추출물 중 Fucosterol 함량시험에 대한 밸리데이션 시험결과 Fucosterol (4.0 ~ 16.0 $\mu\text{g/mL}$)의 범위에서 직선성 및 재현성이 양호한 결과를 얻었으며 정량한계의 결과를 고려해 보았을 때 Fucosterol의 정량한계는 0.75 $\mu\text{g/mL}$ 로서 이는 Fucosterol 함량 시험 기준 농도인 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 3.75 %에 해당하는 농도로서, 이 농도의 범위까지 정량성이 있음을 알 수 있음.

(6) Fucosterol 함량 밸리데이션 결과

경단구슬모자반 추출물 중의 Fucosterol 함량 밸리데이션 시험방법에 대하여 자체 분석방법을 검토한 결과 다음과 같이 요약 할 수 있으며, 경단구슬모자반 함량 밸리데이션 시험법은 적합하다고 판단됨.

(가) 특이성시험

- 경단구슬모자반 추출물 중의 Fucosterol 시험용액을 만들 때 사용하는 MeOH에서 Fucosterol의 피크와 겹침을 확인 한 결과 이들 분석하고자 하는 Fucosterol 피크가 겹치지 않는다는 것을 확인하였고, 또한 Fucosterol 표준액, 경단구슬모자반에서의 회수율은 95.0 - 105.0% 로서 본 시험법은 특이성이 있음을 확인하였음.

(나) 직선성 시험

- 직선성시험에서는 Fucosterol의 별도 3 Group의 직선성 시험용액을 만들고 이들을 가지고 시험한 결과 3 Group 모두 양호한 직선성을 나타내어 본 시험법의 직선성 기준에 적합한 것으로 나타났음.

☞ Fucosterol의 상관계수 (R^2) = 0.99992

☞ 경단구슬모자반 추출물의 상관계수 (R^2) = 0.99989

(다) 정확성 시험

- 정확성시험에서는 직선성 시험에서 얻은 검량선을 가지고, 정확성 시험용액에서 얻은 피크면적을 대입하여 검량선법에 의해 얻어진 결과 값과, 실제로 취한 양을 가지고 계산한 결과 값을 비교해 보았을 때 그의 회수율은 95.0 ~ 105.0% 의 범위 안에 있으며, 회수율의 상대표준편차가 2.0% 이하로서 본 시험법의 정확성을 확인 할 수 있었음.

(라) 피크유지시간 및 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성

- 정확성 및 정밀성의 3가지 시험농도용액(70%, 100%, 130%용액)을 HPLC에 각각 6회 반복 주입하여 얻어진 총 18개의 크로마토그램 중 피크의 유지시간 및 피크면적에 대한 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로서 정밀성을 확인할 수가 있었음.

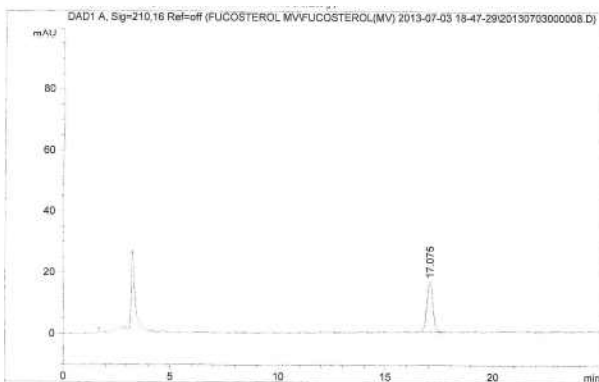
(마) 검출한계 (Detection Limit, DL) 및 정량한계 (Quantitation Limit, QL)

- 위의 직선성시험에서 얻은 검량선을 이용하여 ICH에서 규정하는 방법으로 검출한계(DL) 및 정량한계 (QL)을 구하였음.

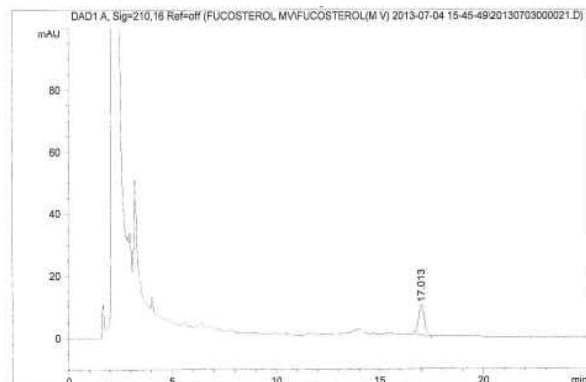
	Fucosterol	경단구슬모자반 추출물
정량한계	0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4.28 mg/50mL
검출한계	0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1.41 mg/50mL

(바) 범위

- Fucosterol(4.0 ~ 16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 범위에서 직선성 및 재현성이 양호한 결과를 얻었으며 정량한계의 결과를 고려해 보았을 때 Fucosterol의 정량한계는 0.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로서 이는 Fucosterol 함량시험 기준 농도인 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 3.75 %에 해당하는 농도로서, 이 농도의 범위까지 정량성이 있음을 알 수 있었음.



<그림 3-70. Fucosterol의 HPLC chromatogram>



<그림 3-71. 경단구슬모자반 추출물의 HPLC chromatogram>

8. 경단구슬모자반에 대한 세포내 항비만 효과 (*in vitro*)

가. 전구지방세포를 이용한 지방세포로의 분화유도 실험 방법

(1) 3T3-L1 지방전구세포의 준비

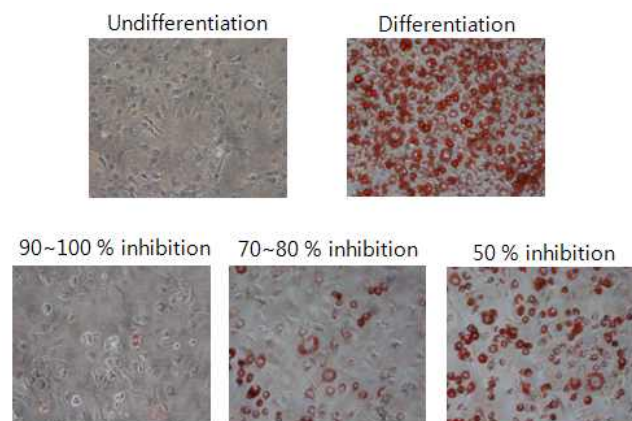
3T3-L1 지방전구세포는 미국세포주은행 (ATCC) 으로부터 구매하여 실험에 사용하였음. 3T3-L1은 지방세포의 대사과정을 연구하는 데에 널리 이용되는 세포주으로써, 상기 세포의 분화가 활발할수록 지방세포 내의 지방 축적이 활발하여 비만을 유도하게 됨. 따라서 항비만 효과를 가질 것으로 생각되는 물질을 상기 세포에 처리하였을 때, 세포의 분화가 적을수록 항비만 효과가 큰 물질인 것으로 볼 수 있음.

(2) 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포로의 분화 유도

마우스 전구지방세포인 3T3-L1을 10 % BCS DMEM 배지를 넣고 37 °C, 5 % CO₂의 조건에서 배양하였음. 3T3-L1 전구지방세포를 24 well plate에 5×10⁴/well의 세포 수로 분주한 후, 100 % confluency 시점이 되면 2일 동안 더 유지시켰음. 전구지방세포는 MDI (0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), 1 uM dexamethasone, 1 ug/ml 인슐린)를 포함하는 10% FBS DMEM 배지로 지방세포 분화를 2일 동안 유도하였고, 배양 48 시간 후, 1 ug/ml 인슐린이 함유된 10% FBS DMEM으로 이틀 동안 배양하였음. 그 후 2일 마다 4일 동안 10 % FBS DMEM 배양액으로 교체하고 지방세포 분화를 유도하는 동안 경단구슬모자반 시료를 25, 50, 100 ug/ml 농도까지 처리하고, 분화가 완성되는 시점인 8일째에 지방세포 분화 정도를 관찰하였음.

(3) 오일 레드 O (Oil Red O) 염색 및 분석

지방의 축적 정도를 확인하기 위해 오일레드 O 염색을 실시하였음. 상기 전구지방세포 분화 유도 방법과 마찬가지로 지방세포의 분화 정도를 오일 레드 O 염색을 통해 1차적으로 현미경을 통해 확인하였고, 지방세포 염색 정도는 510 nm 흡광도에서 세포의 분화 된 지방의 양을 측정하였음.



<그림 3-72. 3T3-L1 세포주를 이용하여 전구지방세포에서 지방세포의 분화 정도에 따른 지방량 감소 정도를 육안과 지방 염색량의 발색정도에 따라 흡광도로 측정하여 평가>

(4) Real-Time PCR

지방세포로 분화 단계에서 C/EBP α 와 PPAR γ 는 분화 된 지방세포에서 발현 양이 증가하고 대부분의 아디포카인 (adipokine) 들의 발현도 증가하게 됨. 지방세포 분화 유도 방법과 마찬가지로 경단구슬모자반 시료를 처리 한 후 8일 동안 분화를 시켜 C/EBP α 와 PPAR γ , 지방세포 분화에 관여하는 유전자들의 발현 정도를 Real-time PCR로 확인하였고. 분화가 완벽히 된 3T3-L1 세포를 PBS로 두 번 세척한 후 Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 넣어서 세포를 용해시킨 후 chloroform (Sigma, ST. Louis, MO, U.S.A)를 넣고 13000rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 얻었음. 상층액과 isopropanol을 섞은 후 반응시켜 RNA를 침전 시킨 후 에탄올로 1회 세척하여 RNA를 분리하여 추출된 RNA를 1 ug 사용하여 cDNA를 합성한 후 SYBR green과 primer를 이용하여 Real-time PCR을 수행하였으며, 대조군 유전자로는 GAPDH를 사용하였음.

<표 3-24. The primer sequence used for real-time PCR>

Target	Primer sequences	Accession No.
GAPDH	5'-GTATGACTCCACTCACGGCAAA-3' (sense)	BC083080
	5'-GGTCTCGCTCCTGGAAGATG-3' (antisense)	
PPAR γ	5'-CGCTGATGCACTGCCTATGA-3' (sense)	NM_011146
	5'-AGAGGTCCACAGAGCTGATTCC-3' (antisense)	
C/EBP α	5'-AGGTGCTGGAGTTGACCAGT-3' (sense)	BC058161
	5'-CAGCCTAGAGATCCAGCGAC-3' (antisense)	
Adiponectin	5'-AGCCTGGAGAAGCCGCTTAT-3' (sense)	NM_009605
	5'-TTGCAGTAGAACTTGCCAGTGC-3' (antisense)	
aP2	5'-CATGGCCAAGCCCAACAT-3' (sense)	NM_024406
	5'-CGCCCAGTTTGAAGGAAATC-3' (antisense)	
Resistin	5'-TCAACTCCCTGTTTCCAAATGC-3' (sense)	NM_022984
	5'-TCTTCACGAATGTCCCACGA-3' (antisense)	
Fas	5'-CTGAGATCCCAGCACTTCTTGA-3' (sense)	NM_007988
	5'-GCCTCCGAAGCCAAATGAG-3' (antisense)	

(5) Western blotting

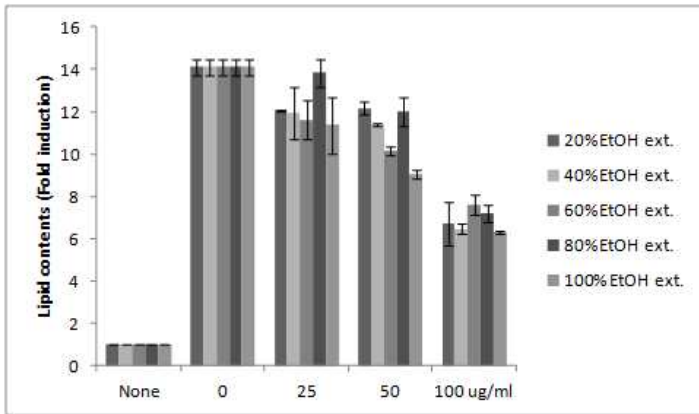
PPAR γ , C/EBP α , Fas 단백질 발현 정도는 지방세포 분화 유도 방법과 같이 3T3-L1 세포에 시료를 이틀 간격으로 처리하고, AMPK 인산화 정도는 MDI 배지에 시료를 30분, 1시간, 2시간, 3시간 시간별로 처리하여 세포를 PBS로 두 번 wash하고 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150mM sodium chloride, 1 % NP-40, 0.5 % sodium dexycolate, 0.1 % sodium dodecyl sulfate, protease inhibitor)를 이용하여 세포를 용해시켰다. 13000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 단백질을 추출 정량하여 8 % SDS-PAGE gel을 이용하여 전기영동하고 전기 영동된 단백질을 membrane에 이동시킨 후 5% skim milk를 포함하는 TBST로 blocking 하였음. 1차 항체 (PPAR γ , C/EBP α) SantaCruz, (AMPK, ACC, Fas) Cell signaling과 2차 항체 Cell signaling으로 반응시킨 후 ECL을 통해 각 단백질의 발현 정도를 β -actin의 발현 정도와 비교하여 평가하였음.

나. 경단구슬모자반 추출 시료에 대한 세포내 항비만 효과 측정 결과

(1) 경단구슬모자반 추출물 선정을 위한 지방세포 분화억제 효과

(가) 경단구슬모자반 농도별 에탄올 추출물의 지방세포 분화 억제 효과

마우스의 전구지방세포인 3T3-L1 세포주를 이용하여 지방 세포로의 분화억제 실험을 수행한 결과, 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 경단구슬모자반 추출물 20, 40, 60, 80, 100% 에탄올 추출물에서 농도 의존적으로 분화를 억제시키는 효과가 나타났음.

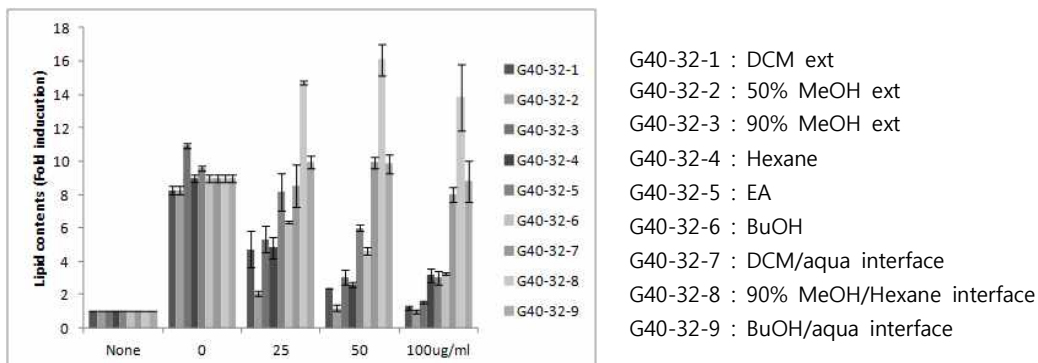


<그림 3-73. The effects of various ethanol extracts of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt on differentiation in 3T3-L1 cells>

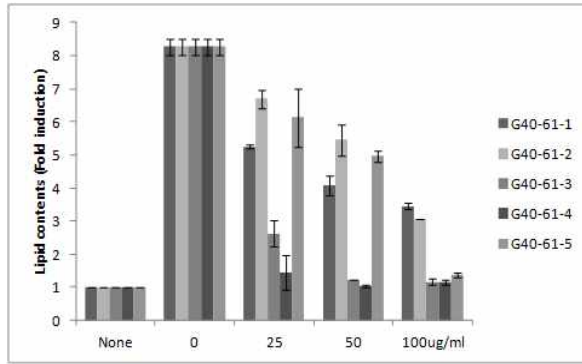
(나) 경단구슬모자반 추출 분획별 지방세포 분화 억제 효과

① DCM, 50% MeOH, 90% MeOH, Hexane, EA, Buthanol, DCM/aqua interface, 90% MeOH/Hexane interface, BuOH/aqua interface fraction 활성 확인

② 3T3-L1 세포에서 경단구슬모자반의 fraction별 분화억제 활성을 확인해 본 결과 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 Hexane, MC, EA, BuOH 층 모두에서 지방분화 억제 효능이 우수하게 나타났고 특히 EA층에서 분화억제 효능이 가장 우수한 것으로 나타났으므로 EA층 추출물로부터 세분화된 fraction들을 분리하여 지방세포 분화 억제평가를 실시한 결과 61-3, 4번 fraction에서 분화억제가 효과가 가장 우수한 것으로 확인됨 (그림 3-74, 3-75).



<그림 3-74. The effects of fractions isolated from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt extract on differentiation in 3T3-L1 cells>



G40-61-1~5 : EA fraction

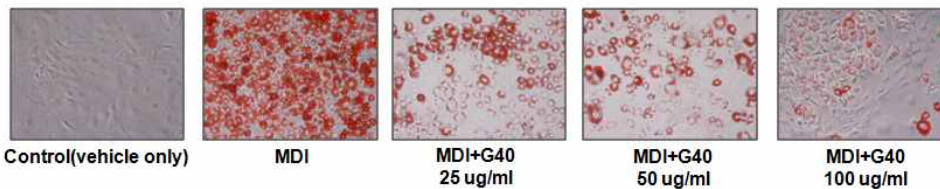
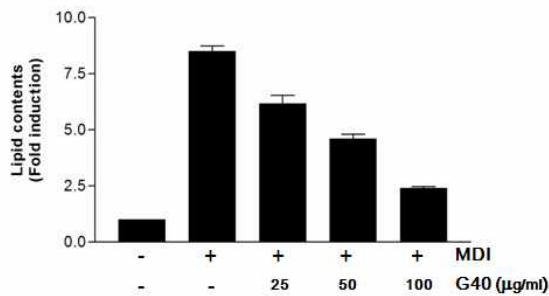
<그림 3-75. The effects of sub-fractions isolated from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt ethyacetate extract on differentiation in 3T3-L1 cells>

(2) 경단구슬모자반 60 % 주정 추출물 지방세포 분화억제 효과

(가) 경단구슬모자반 농도별 지방세포 분화 억제 활성을 수행하여 효능이 우수한 시료와 수율을 고려하여 최종 선별된 60% 주정 추출물을 통해 지방분화 억제 활성 확인

(나) 마우스의 전구지방세포인 3T3-L1 세포주를 이용하여 지방 세포로의 분화억제 실험을 수행한 결과, 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 경단구슬모자반 추출물 60 % 에탄올 추출물은 농도 의존적으로 분화를 억제시키는 효과가 나타났음.

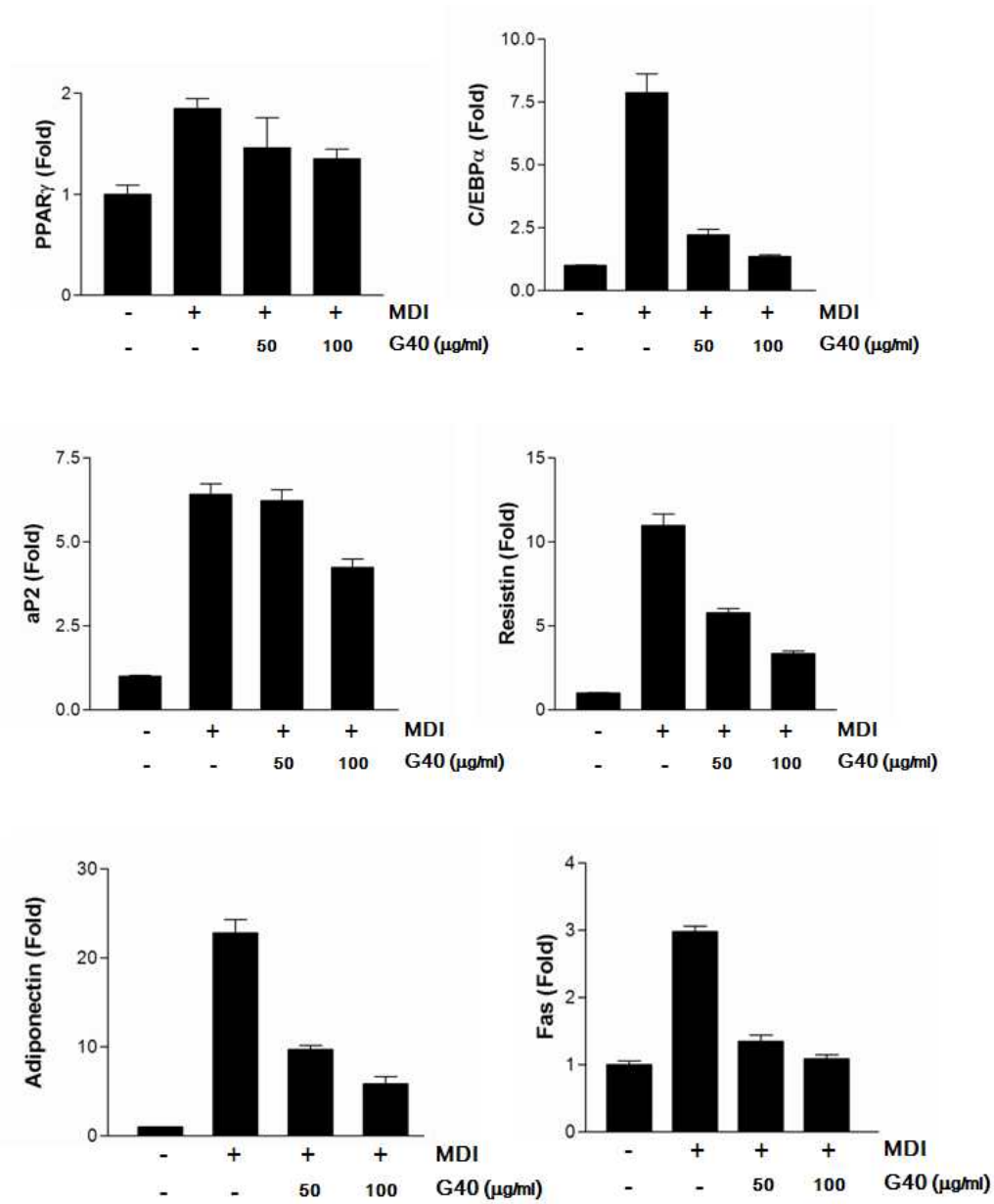
<60% 주정 추출물 >



<그림 3-76. The effects of 60% ethanol extracts of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt on differentiation in 3T3-L1 cells>

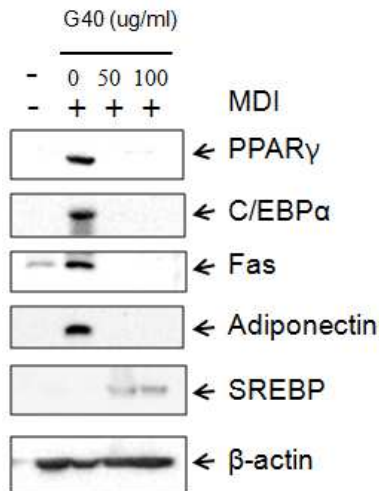
(3) 경단구슬모자반 추출물의 작용기전 연구

(가) 경단구슬모자반 추출물에 의한 비만 관련 유전자 발현 억제 활성



<그림 3-77. The effects of extracts of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt on PPAR γ , C/EBP α , adipokine mRNA expression in differentiated 3T3-L1 cells>

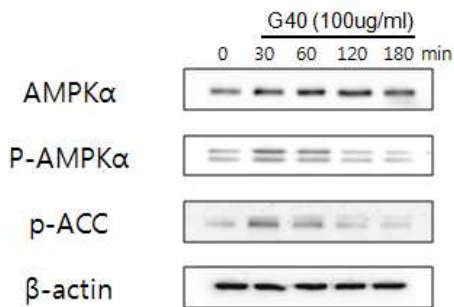
(나) 경단구슬모자반 60% 주정 추출물에 의한 PPAR γ , C/EBP α , Fas, adiponectin, SREBP 활성화



<그림 3-78. The effects of extracts of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt on PPAR γ , C/EBP α , adipokine expression in differentiated 3T3-L1 cells>

① 경단구슬모자반 60% 주정 추출물에 의한 지방축적 감소의 분자생물학적 메커니즘을 확인하기 위해 지방전구세포의 분화를 유도하면서 추출물을 8일 동안 처리 한 후 PPAR γ , C/EBP α 의 유전자 및 단백질 발현 정도와 adipokine mRNA 유전자 발현을 확인하였음.(그림 3-77, 3-78). 그림 3-74, 3-75에서 보여주듯이 지방세포 분화에서 특이적으로 발현되는 유전자 marker의 발현이 경단구슬모자반 주정 추출물에 의해 억제됨을 확인하였음. 단백질 발현 기전에서도 경단구슬모자반에 의해 억제됨을 확인하였으나, SREBP의 경우 증가하는 경향을 보였음.

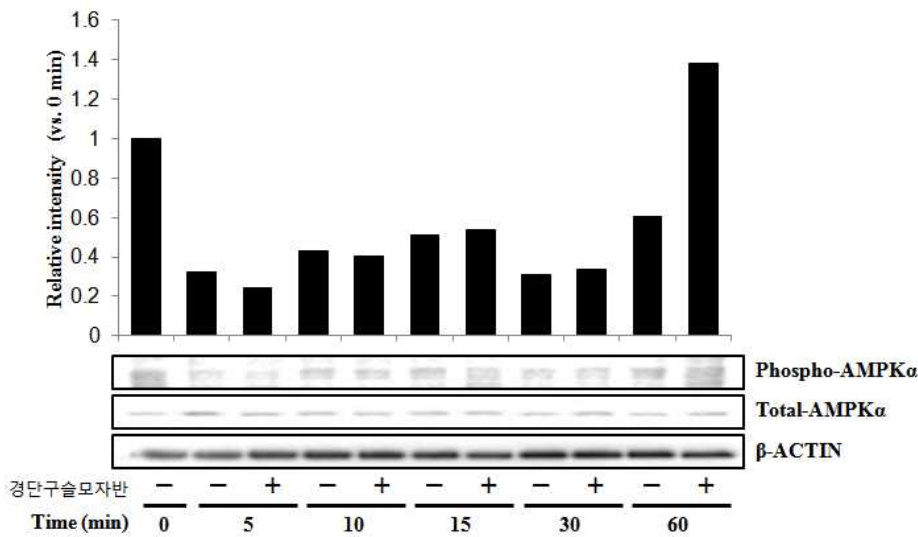
(다) 경단구슬모자반 60% 주정 추출물에 의한 AMPK 작용기전 탐색



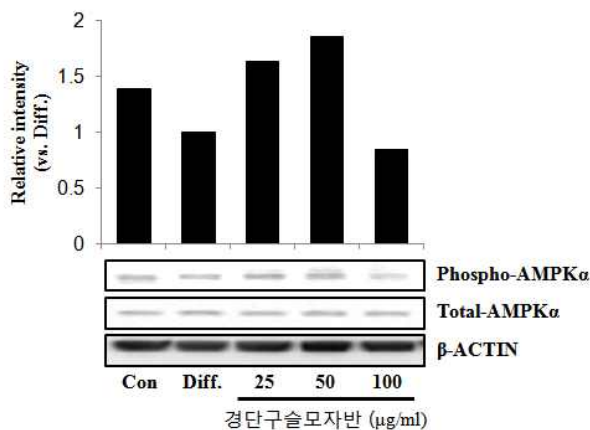
<그림 3-79. The effects of AMPK phosphorylation by *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt>

① AMPK는 α , β , γ 세가지 subunit으로 구성되어 있음. 이중 AMPK α 는 catalytic subunit으

로 Thr172의 인산화는 AMPK를 활성화시키는데 매우 중요한 역할을 함. AMPK가 인산화 되어 활성화되면 지방을 합성하는 단백질의 활성은 억제되고 지방분해 단백질의 활성이 증가함. Acetyl-CoA carboxylase(ACC)는 acetyl-CoA를 malonyl-CoA로 변환시켜 지방합성을 증가시키는 단백질로써 AMPK에 의해 인산화되면 그 활성이 억제됨. 경단구슬모자반이 지방합성에 있어서 중심적인 조절단백질의 역할을 하는 AMPK의 인산화에 영향을 주는지 알아보기 위해 MDI로 지방세포분화를 유도함과 동시에 경단구슬모자반 60% 주정 추출물 100 ug/ml을 지방전구세포의 분화를 유도하면서 추출물을 30분, 1시간, 2시간, 3시간 시간별로 처리 한 후 AMPK 신호전달 관련 단백질 발현 정도 확인하였음 (그림 3-80). 그 결과 경단구슬모자반을 처리한 30분과 1시간에서 AMPK의 인산화가 가장 증가하는 것을 확인할 수 있었음.



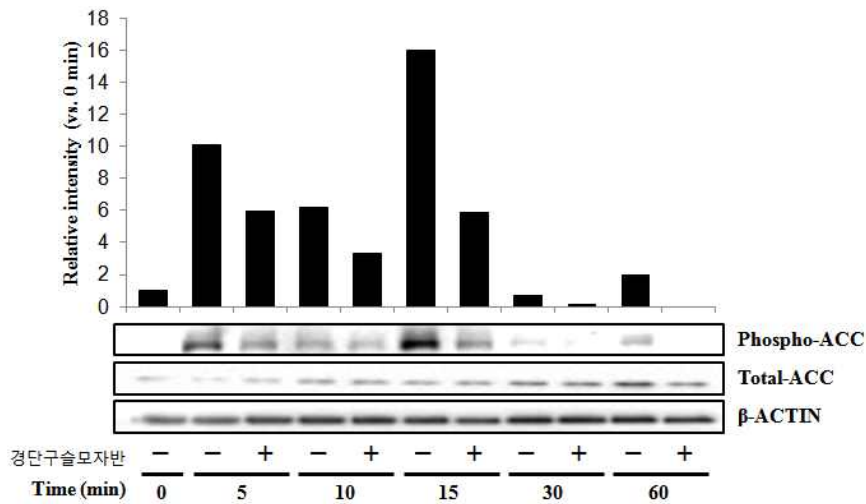
<그림 3-80. The effects of AMPK phosphorylation by *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt>



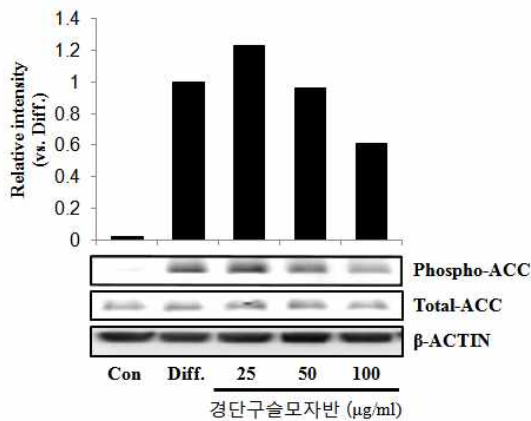
<그림 3-81. The effects of AMPK phosphorylation by *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt>

② 두 번째로 지방세포분화를 유도함과 동시에 경단구슬모자반을 50 ug/ml로 처리하고 각 시

간별로 phospho-AMPK의 양을 western blot으로 측정한 결과 경단구슬모자반을 처리하면 5분, 10분에는 AMPK α 의 인산화가 대조군에 비해 감소하는 경향이 나타났으나 60분에는 경단구슬모자반을 처리한 실험군에서 가장 강한 AMPK α 의 인산화가 나타났음. 또한 경단구슬모자반 50 $\mu\text{g/ml}$ 을 15분 처리하고 농도별로 확인해본 결과 AMPK 인산화가 감소하는 것을 확인하였음.



<그림 3-82. The effects of ACC phosphorylation by *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt>

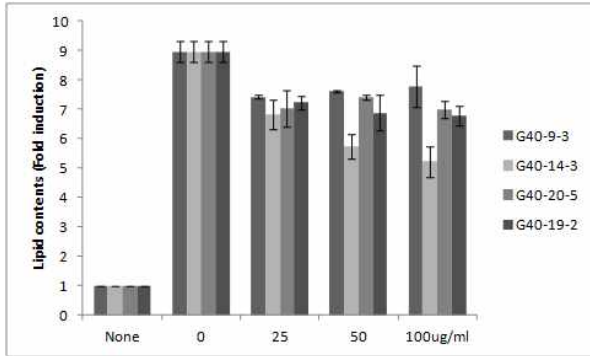


<그림 3-83. The effects of ACC phosphorylation by *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt>

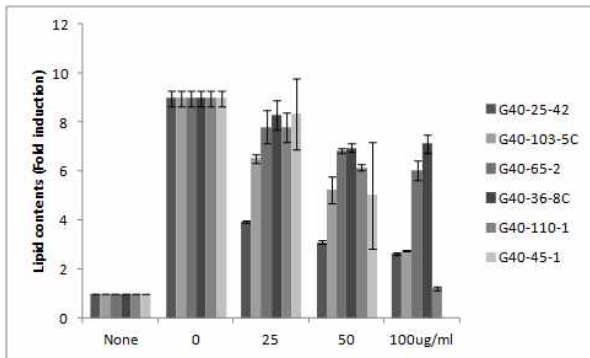
③ AMPK는 ACC의 인산화를 유도하여 ACC활성을 낮추어 지방합성을 억제시킴. 이에 경단구슬모자반이 ACC의 활성화에 미치는 영향을 알아보기로 ACC의 serine 79번의 인산화 정도를 western blot으로 측정한 결과 AMPK와 마찬가지로 경단구슬모자반은 ACC의 인산화를 시간별, 농도별로 억제하였음.

(4) 경단구슬모자반에서 분리된 유효물질의 지방세포 분화억제 효과

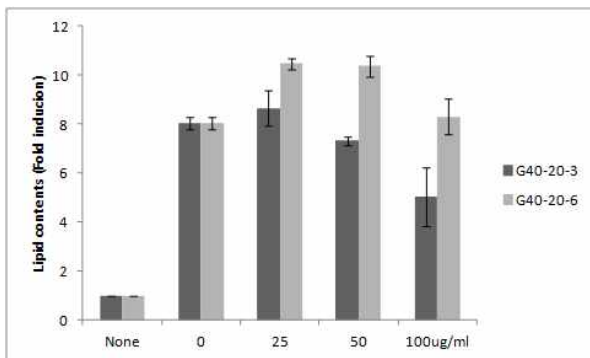
경단구슬모자반 추출물에서 분리된 유효물질 12종 중 전구지방세포에서의 지방을 유도한 후 지방분화 억제 활성을 확인해 본 결과, G40-25-42가 효능이 가장 우수하였고, G40-110-1도 100ug/ml 농도에서 분화 억제 효능이 우수한 것으로 나타났음. (그림 3-84).



- G40-9-3 : fucosterol
- G40-14-3 : Grasshopper ketone
- G40-20-5 : (-)-loliolide
- G40-19-2 : (3S,5R,8R)-3-acetoxy-5-hydroxymegastigma-6,7-dien-9-one



- **G40-25-42 : Saringosterol**
- G40-103-5C : dehydrovomifoliol
- G40-65-2 : 4-hydroxybenzoic acid
- G40-36-8C : Oleic acid methyl ester
- **G40-110-1 : 3-hydroxy-*apo*-13'-fucoxanthinone**
- G40-45-1 : Apo-13'-fucoxanthinone

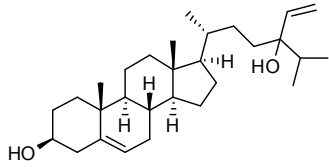


- G40-20-3 : 5 α ,6 α -epoxy-3 β -hydroxy-7-megastigma-9-one
- G40-20-6 : 5-hydroxy-5-propyl-3,4-dimethylfuran-2(5H)-one

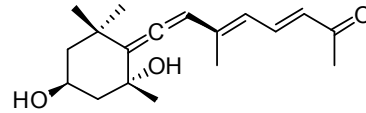
<그림 3-84. The effect of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt pilot extract on differentiation in 3T3-L1 cells>

(5) 경단구슬모자반에서 분리된 유효물질의 지방세포 분화억제 효과

(가) 효능이 우수한 유효물질 구조



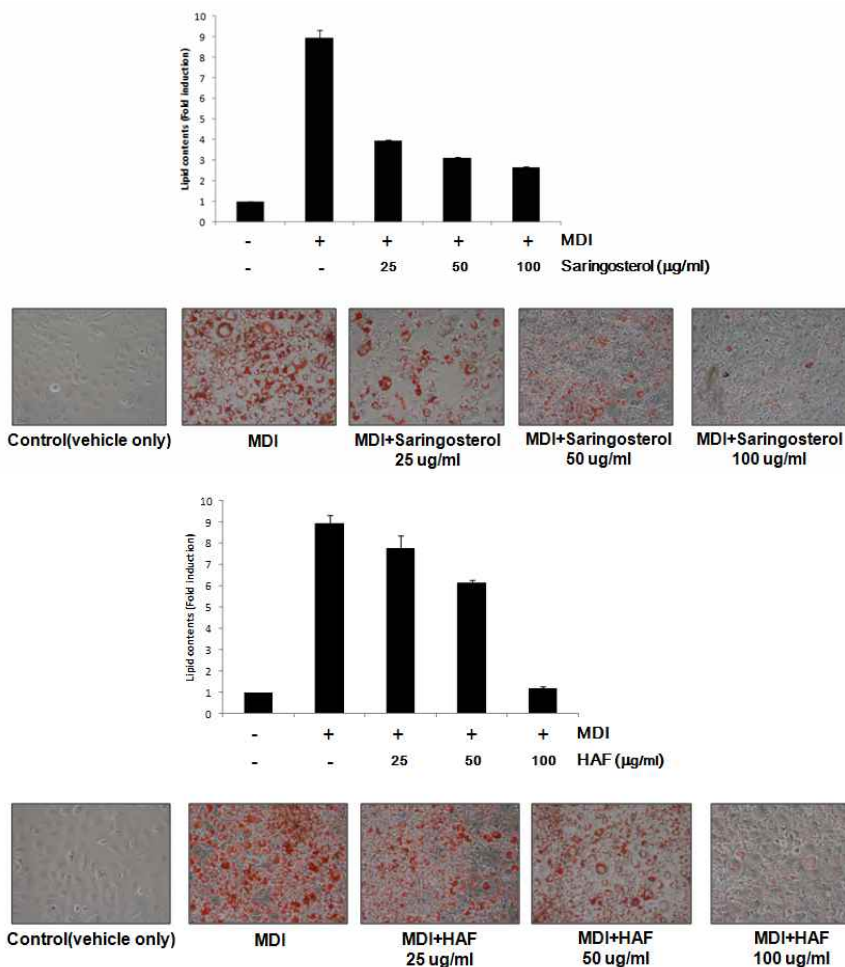
G40-25-42 (compound 7)의 구조



G40-110-1 (compound 2)의 구조

(나) 지방세포 분화 억제 효과

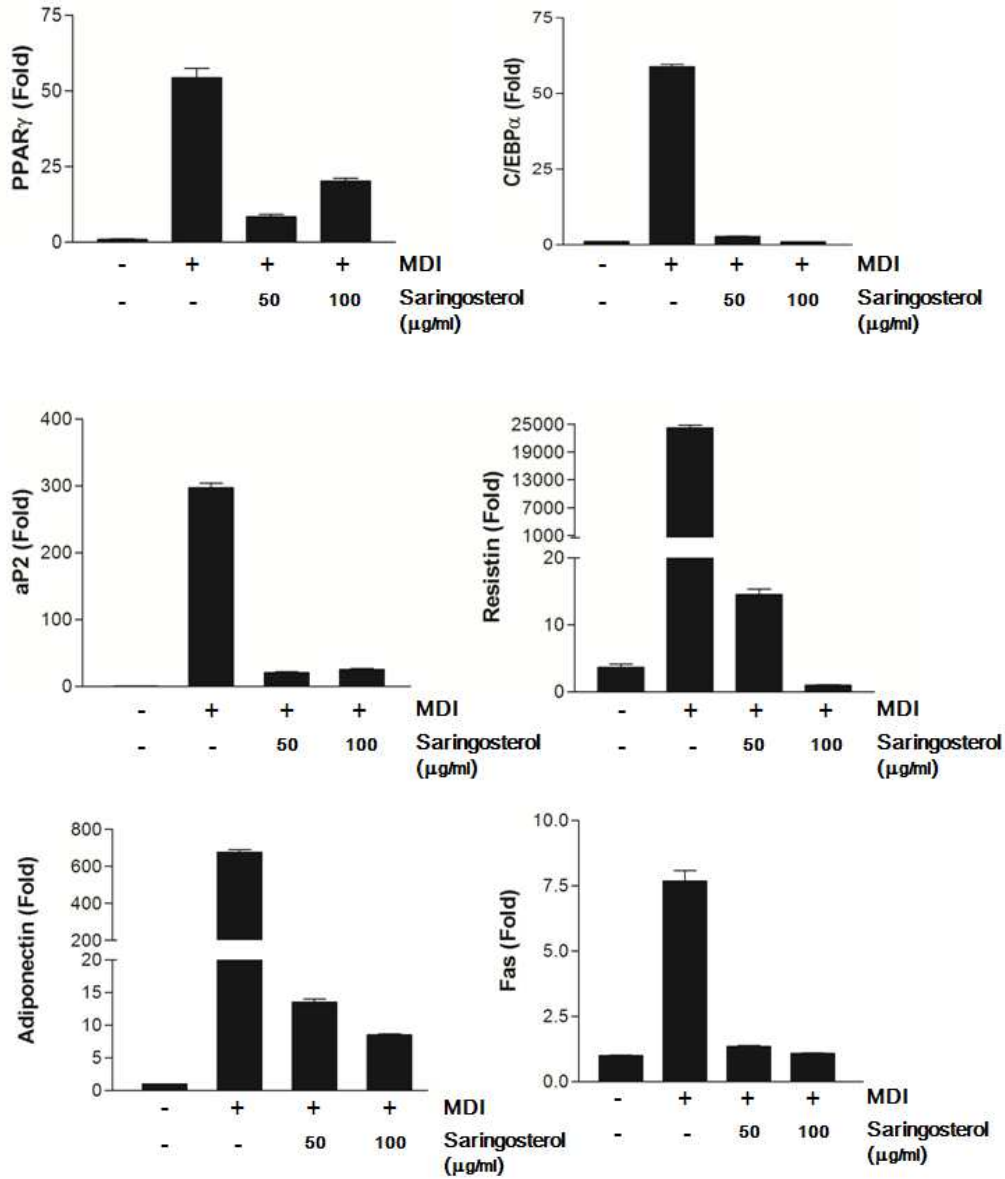
마우스의 전구지방세포인 3T3-L1 세포주를 이용하여 지방 세포로의 분화억제 실험을 수행한 결과, 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 G40-25-42과 G40-110-1은 농도 의존적으로 분화를 억제시키는 효과가 나타났다.



<그림 3-85. The effects of compounds on differentiation in 3T3-L1 cells>

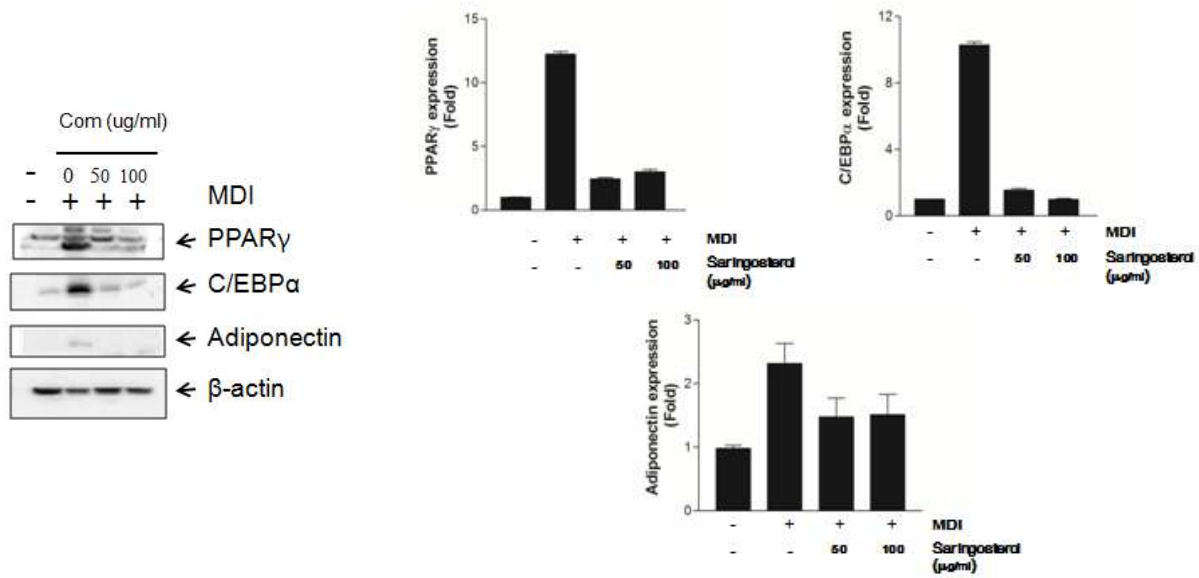
(6) 유효물질(Saringosterol)의 작용기전 연구

(가) 경단구슬모자반에서 분리된 유효물질(Saringosterol)에 의한 비만 관련 유전자 발현 억제 활성



<그림 3-86. The effects of extracts of saringosterol on PPAR γ , C/EBP α , adipokine mRNA expression in differentiated 3T3-L1 cells.

(나) 경단구슬모자반에서 분리된 유효물질(Saringosterol)에 의한 비만 관련 단백질 발현 억제 활성



<그림 3-87. The effects of extracts of saringosterol on PPAR_γ, C/EBP_α, adipokine expression in differentiated 3T3-L1 cells>

- 경단구슬모자반 추출물에 분리된 유효물질 saringosterol의 지방축적 감소의 분자생물학적 메커니즘을 확인하기 위해 지방전구세포의 분화를 유도하면서 추출물을 8일 동안 처리 한 후 PPAR_γ, C/EBP_α의 유전자 및 단백질 발현 정도와 adipokine mRNA 유전자 발현을 확인하였음.(그림 3-86, 3-87). 그림 3-86, 3-87에서 보여주듯이 지방세포 분화에서 특이적으로 발현되는 유전자 marker의 mRNA 발현과 단백질 발현이 saringosterol에 의해 억제됨을 확인하였음.

(7) 경단구슬 유효물질인 Saringosterol에서 분리된 최종 compound의 지방분화 억제 활성

- Mixture 화합물인 saringosterol에서 최종 단일물질인 6종의 화합물을 분리하여 지방분화 억제 활성을 확인한 결과 대부분의 화합물에서 지방분화 억제 효능이 있는 것으로 나타났음. 그러나 compound 2, 3을 제외한 화합물에서 세포독성이 나타났음. 지방세포 분화 억제 효능은 세포독성이 나타나는 농도를 제외하고 측정하였음.

<표3-25. 지방세포 분화 억제 효능>

구분	화합물명	IC ₅₀ (uM)
Compound 1	24-keto-cholesterol	43.67
Compound 2	24S-saringosterol	96.05
Compound 3	24-saringosterol	59.24
Compound 4	24R-saringosterol	16.52
Compound 5	7β-hydroxyfucosterol	-
Compound 6	7α-hydroxyfucosterol	-

9. 경단구슬모자반 추출 시료에 대한 동물내 간이독성 및 유효성 평가 결과

가. 실험동물의 사육

실험동물은 코아텍에서 구입하였으며, 실험동물들이 변화된 주변 환경과 온도, 습도, 먹이 등에 적응하게 하기 위해 실험 시작 전 1주일 동안 순화시킨 후 건강한 동물만을 이용하여 실험을 시작하였음. 실험동물실의 사육환경은 온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $45\pm 10\%$, 환기회수 10-15회/hr, 조명 12시간 간격, 조도 150-250 Lux, 소음 60dB 이하로 조절하였음. 기본적으로 Polycarbonate 사육 상자 당 5마리씩 사육하였으며 주 2회 상자를 교환하여 암모니아 농도가 20ppm 이하가 되게 유지하였고 사료는 자율 급여하였으며, 음수는 정수된 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였음.

나. 3주 반복투여 용량설정 (MTD : Maximum Tolerated Dose)

(1) 실험방법

(가) 최적 추출공정법을 통해 대량생산된 경단구슬모자반 60% 주정 추출물을 이용 간이독성 평가를 통해 안전하고 유효한 농도를 알아보기 위하여 MTD (Maximum Tolerated Dose) 시험을 진행하였음. C57BL/6 male 마우스를 이용하여 1주일 동안의 순화시킨 후, 무작위 법을 이용하여 균을 분리한 후 경단구슬모자반 60% 주정 추출물을 50mg/kg~2000mg/kg의 용량까지 경구투여용 존데를 이용하여 3주간 매일 같은 시간에 주 3회 투여하여한 후 체중도 측정하였음.

<표 3-26. MTD 동물실험 군설정>

Group	Treatment	No. of Mouse
I	Vehicle(Saline)	10
II	경단구슬모자반 50mg/kg	10
III	경단구슬모자반 100mg/kg	10
IV	경단구슬모자반 250mg/kg	10
V	경단구슬모자반 500mg/kg	10
VI	경단구슬모자반 1000mg/kg	10
VII	경단구슬모자반 2000mg/kg	10

(나) 혈구 및 혈액 생화학 분석 방법

3주간의 투여가 끝난 후 생존한 모든 동물에 대하여 혈구 및 혈액분석을 실시함. 동물을 하룻밤 절식시킨 후 이소플로란 마취하에 개복하여 복대정맥으로부터 채혈한 혈액을 항응고제인 EDTA가 들어있는 채혈병에 넣어 혈구자동계측장치(BECKMAN Counter, USA)를 이용하여 WBC(white blood cell) count, RBC(red blood cell) count, Hemoglobin, Hematocrit, MCV(mean corpuscular volume), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentraion), Platelet을 측정하였다. 생화학 분석은 혈액을 원심분리기를 이용하여 혈장을 채취한 다음 혈액생화학분석기(Hitachi 7020, Japan)를 이용하여 혈액의 생화학지표인 GOT, GPT, Total cholesterol, Triglyceride, HDL cholesterol, LDL cholesterol, LDH, Creatinine, IP, BUN, Albumin, Total bilirubin, Glucose를 분석하였음.

(2) 실험결과

(가) 3주 후 체중 변화량과 사망률을 측정한 결과 모든 투여군에서 대조군 대비 유의한 체중변화는 나타나지 않았고, 사망한 개체도 발생하지 않았음 (표3-27).

<표 3-27. 경단구슬모자반 추출물 3주 반복 경구 투여 후 체중변화량과 사망률 결과>

Dose	Body Weight(g) (first day)	Body Weight(g) (after 3weeks)	Change in body	
			Weight at end of Study (g)	Mortality
Vehicle	21.4 ± 0.8	24.5 ± 0.8	3.1	0
50mg/kg	21.4 ± 1.0	24.2 ± 0.9	3.4	0
100mg/kg	22.1 ± 1.0	25.1 ± 1.2	3.0	0
250mg/kg	21.6 ± 0.7	24.7 ± 1.2	3.1	0
500mg/kg	21.1 ± 0.8	23.5 ± 1.1	2.4	0
1000mg/kg	20.7 ± 0.9	24.2 ± 1.2	3.5	0
2000mg/kg	20.6 ± 1.2	23.8 ± 1.5	3.2	0

(나) 각 개체의 혈액을 채취해 혈구분석 및 혈액 내 생화학 분석을 수행한 결과 통계적으로 유의한 수치변화는 관찰되지 않았음(표 3-28, 3-29).

<표 3-28. 경단구슬모자반 추출물 3주 반복투여 후 혈구분석 결과>

	WBC (X10 ³ /μL)	RBC (X10 ⁶ /μL)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)
Vehicle	6.78 ± 1.11	8.71 ± 1.85	13.36 ± 2.79	42.32 ± 8.98
50mg/kg	6.74 ± 2.01	8.96 ± 1.5	13.69 ± 2.45	43.73 ± 7.62
100mg/kg	6.77 ± 1.78	9.47 ± 0.61	14.47 ± 0.98	46.77 ± 3.16
250mg/kg	7.33 ± 2.09	9.59 ± 0.43	14.67 ± 0.67	46.19 ± 2.15
500mg/kg	7.16 ± 2.55	9.04 ± 1.98	13.97 ± 3.06	43.38 ± 9.61
1000mg/kg	6.71 ± 1.49	9.35 ± 0.77	14.47 ± 1.18	44.59 ± 3.73
2000mg/kg	6.24 ± 1.65	9.43 ± 0.31	14.49 ± 0.44	45.02 ± 1.27
	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet (X10 ³ /μL)
Vehicle	48.57 ± 0.77	15.35 ± 0.13	31.58 ± 0.42	1008.5 ± 249.42
50mg/kg	48.74 ± 0.78	15.24 ± 0.3	31.26 ± 0.54	954.6 ± 233.62
100mg/kg	49.34 ± 0.55	15.26 ± 0.24	30.94 ± 0.34	939.8 ± 217.98
250mg/kg	48.19 ± 0.5	15.28 ± 0.15	31.73 ± 0.3	1062.3 ± 199.88
500mg/kg	47.95 ± 0.5	15.49 ± 0.2	32.29 ± 0.53	1117.1 ± 280.14
1000mg/kg	47.68 ± 0.6	15.47 ± 0.16	32.47 ± 0.22	1089.6 ± 285.88
2000mg/kg	47.76 ± 0.79	15.37 ± 0.14	32.2 ± 0.35	1259.9 ± 148.88

<표 3-29. 혈장 생화학분석 결과>

	GOT(U/L)	GPT(U/L)	Total Cholesterol(mg/dL)	Triglyceride(mg/dL)
Normal Control	98.72 ± 5.12	31.29 ± 1.12	130.37 ± 20.14	102.11 ± 9.62
50mg/kg	106.27 ± 4.48	37.85 ± 2.14	155.22 ± 18.95	103.47 ± 12.21
100mg/kg	117.17 ± 5.14	22.51 ± 2.18	138.54 ± 16.24	129.45 ± 16.25
250mg/kg	91.84 ± 6.93	35.35 ± 3.21	116.83 ± 25.01	91.92 ± 11.32
500mg/kg	92.26 ± 4.21	36.79 ± 2.54	142.84 ± 6.84	90.76 ± 14.02
1000mg/kg	108.79 ± 2.16	42.49 ± 3.65	126.83 ± 15.02	97.95 ± 9.85
2000mg/kg	101.10 ± 5.62	34.01 ± 2.14	153.12 ± 19.32	89.12 ± 11.36
	HDL(mg/dL)	LDL(mg/dL)	LDH (U/L)	Glucose(mg/dL)
Normal Control	79.71 ± 5.25	9.89 ± 1.12	128.53 ± 25.75	158.2 ± 14.21
50mg/kg	69.39 ± 13.26	8.87 ± 2.51	120.35 ± 15.24	154.4 ± 22.21
100mg/kg	65.25 ± 11.95	8.25 ± 1.51	138.15 ± 16.38	168.2 ± 16.36
250mg/kg	66.38 ± 9.61	8.94 ± 0.41	139.21 ± 17.24	152.0 ± 13.65
500mg/kg	71.25 ± 6.84	8.04 ± 1.21	118.04 ± 19.21	157.6 ± 15.68
1000mg/kg	68.23 ± 11.87	7.41 ± 0.39	123.25 ± 11.21	148.6 ± 14.94
2000mg/kg	65.21 ± 10.87	7.55 ± 0.99	125.24 ± 16.25	145.3 ± 14.74
	BUN(mg/dL)	Albumin(g/dL)	Total Bilirubin(mg/dL)	IP(mg/dL)
Normal Control	23.6 ± 0.1	1.88 ± 0.11	0.040 ± 0.001	9.21 ± 0.80
50mg/kg	23.6 ± 0.9	1.95 ± 0.10	0.014 ± 0.001	9.65 ± 0.39
100mg/kg	25.9 ± 1.2	1.85 ± 0.07	0.025 ± 0.002	10.12 ± 0.42
250mg/kg	27.5 ± 1.6	1.87 ± 0.06	0.036 ± 0.001	8.14 ± 0.59
500mg/kg	26.6 ± 0.9	1.88 ± 0.07	0.052 ± 0.001	8.36 ± 0.12
1000mg/kg	28.1 ± 1.6	1.91 ± 0.11	0.062 ± 0.002	9.17 ± 0.95
2000mg/kg	26.2 ± 2.3	1.89 ± 0.05	0.047 ± 0.001	9.14 ± 0.10

다. DIO I mouse model을 이용한 *in vivo* 항비만 유효성 평가

(1) 실험방법

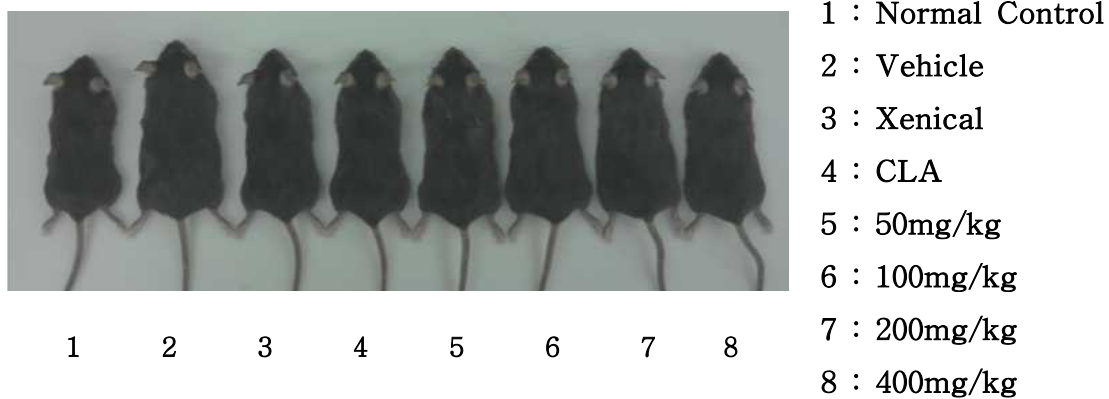
6주령의 C57BL/6 마우스를 체중이 높은 순으로 배열하고 군 간의 평균과 표준편차가 균등하게 되도록 분리한 이후 6주간 고지방 식이 (60%칼로리 지방식이)와 음성대조군(Vehicle), 양성대조군 (제니칼 :현재 시판되는 비만치료제, CLA :콜레스테롤 저하 기능을 나타내는 개별 인정형 건강기능식품), 표준화된 경단구슬모자반 60% 주정 추출물을 농도별로 (50, 100, 200, 400mg/kg) 경구투여 함. 6주간 실험을 진행하였으며 체중과 사료섭취량은 주 3회 측정하였고 6주 투여 후 동물을 희생하여 복부 및 내장지방과 간을 적출하여 10% Formalin에 고정하여 처리하고, 혈액은 채취하여 혈구, 혈액생화학 분석을 실시함.

<표 3-30. 경단구슬모자반 항비만 유효성 평가 군설정>

Group	Treatment	No. of Mouse
I	정상군	10
II	대조군(비만유발군)	10
III	Xenical 6mg/kg	10
IV	CLA 80mg/kg	10
V	경단구슬모자반 50mg/kg	10
VI	경단구슬모자반 100mg/kg	10
VII	경단구슬모자반 200mg/kg	10
VIII	경단구슬모자반 400mg/kg	10

(2) 실험결과

6주후 아래와 같이 각각의 군별로 평균적인 결과 값을 나타내는 개체를 선택하여 외형사진을 비교 관찰하였음 (그림3-88).



<그림 3-88. 경단구슬모자반 추출물 투여군과 대조군의 마우스 외형사진 비교 관찰>

(가) 비만유도 마우스를 이용한 경단구슬모자반 투여군과 대조군의 체중감소 효능비교

○ 6주간 고지방 식이와 함께 경단구슬모자반 추출물을 농도별로 투여한 결과 vehicle 투여군에서는 11.84g의 체중이 증가한 반면 경단구슬모자반 추출물 100mg/kg, 200mg/kg, 400mg/kg 의 용량으로 투여한 군에서는 각각 10.14g, 9.86g, 9.66g의 체중증가를 나타내어 대조군 (vehicle 투여군)에 비해 체중억제 비율이 27.28%, 31.78%, 34.99% 로 좋은 효과가 관찰되었으며 (표 3-31), 이는 내장지방의 분포도를 알아보기 위해 부고환지방, 피하지방, 복막하지방의 지방량을 측정 한 정량결과와도 비슷한 결과로 나타남 (표 3-32).

<표 3-31. 경단구슬모자반 투여군과 대조군의 체중감소 효과>

Dose	Body Weight(g) (First day)	Body Weight(g) (after 6 weeks)	Change in body weight at end of study (g)	Inhibition rate (%)
Normal Control	20.0 ± 0.6	26.2 ± 2.0	5.61	-
Vehicle	21.0 ± 0.5	32.9 ± 2.3	11.84	-
Xenical	21.1 ± 0.9	30.6 ± 2.1	9.51	37.39
CLA	21.3 ± 0.8	31.3 ± 1.5	10.07	28.41
50mg/kg	21.0 ± 0.7	32.4 ± 2.3	11.38	7.38
100mg/kg	21.0 ± 0.6	31.2 ± 0.9	10.14	27.28
200mg/kg	21.0 ± 0.6	30.9 ± 1.8	9.86	31.78
400mg/kg	21.1 ± 0.9	30.7 ± 3.2	9.66	34.99

<표 3-32. 경단구슬모자반 투여군의 피하지방(A), 부고환지방(B), 복막하지방(C) 축적 억제율>

(A) 피하지방 축적 억제율

	Subcutaneous fat weight(g)	Inhibition rate(%)
Normal Control	0.420 ± 0.177	-
vehicle	1.294 ± 0.381	-
Xenical	1.048 ± 0.276	19.0
CLA	1.065 ± 0.291	17.7
50mg/kg	1.023 ± 0.189	21.0
100mg/kg	0.934 ± 0.350	27.9
200mg/kg	0.888 ± 0.204	31.4
400mg/kg	0.796 ± 0.258	38.5

(B) 부고환지방 축적 억제율

	Epididymal fat weight(g)	Inhibition rate(%)
Normal Control	0.544 ± 0.144	-
vehicle	1.502 ± 0.269	-
Xenical	1.490 ± 0.250	0.8
CLA	1.248 ± 0.386	17.0
50mg/kg	1.297 ± 0.245	13.7
100mg/kg	1.017 ± 0.336	32.3
200mg/kg	1.109 ± 0.251	26.2
400mg/kg	1.131 ± 0.273	24.7

(C) 복막하지방 축적 억제

	Peritoneal fat weight(g)	Inhibition rate(%)
Normal Control	0.143 ± 0.045	-
vehicle	0.737 ± 0.090	-
Xenical	0.546 ± 0.132	25.9
CLA	0.497 ± 0.193	32.6
50mg/kg	0.507 ± 0.061	31.2
100mg/kg	0.470 ± 0.145	36.3
200mg/kg	0.483 ± 0.072	34.4
400mg/kg	0.445 ± 0.100	39.7

(나) 경단구슬모자반 추출물 투여군에서의 혈구수치 및 생화학 수치분석

○ 동물을 하룻밤 절식시킨 후 이소플로란 마취하에 개복하여 복대정맥으로부터 채혈한 혈액을 항응고제인 EDTA가 들어있는 채혈병에 넣어 혈구자동계측장치(BECKMAN Coulter, USA)를 이용하여 WBC(white blood cell) count, RBC(red blood cell) count, Hemoglobin, Hematocrit, MCV(mean corpuscular volume), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentraion), Platelet을 측정하였음. 혈구분석 결과 모든 투여군의 검사항목에서 추출물 투여와 관련되어 독성 및 다른 영향을 나타내는 유의적인 수치 변화는 관찰되지 않음 (표 3-33). 혈액 생화학분석 결과 고지혈증의 지표 항목인 총 콜레스테롤의 수치는 음성대조군이 176.37±19.90mg/dl인 반면 400mg/kg 투여군에서는 161.12±14.34mg/dl이었으며 혈중 중성지방 역시 음성대조군 109.61±16.70mg/dl, 200mg/kg 투여군에서 48.98±17.35mg/dl로 음성대조군에 비해 현저한 감소를 나타냄(표 3-34).

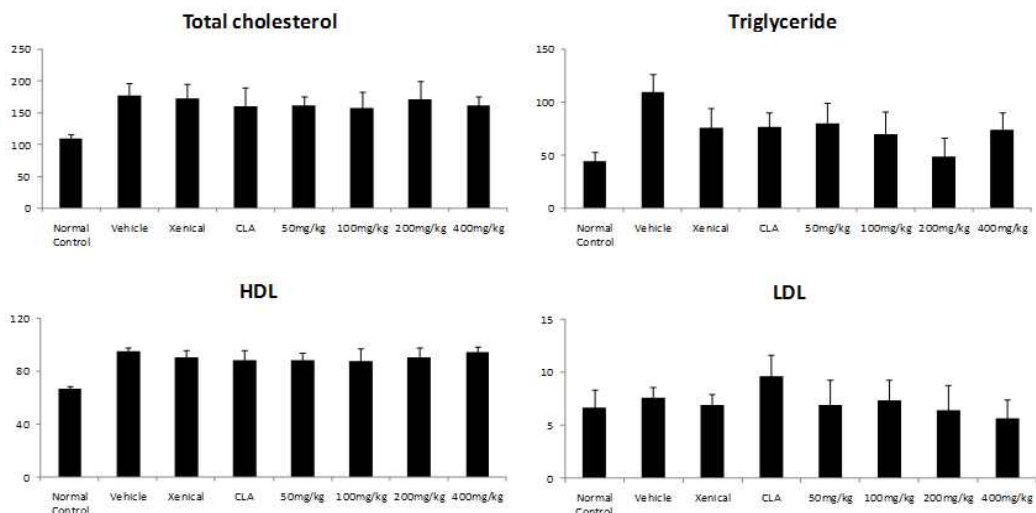
<표 3-33. 고지방식으로 유도한 DIO I model에서 경단구슬모자반추출물 투여 후 혈구분석 결과>

	WBC (X10 ³ /μL)	RBC (X10 ⁶ /μL)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)
Normal Control	7.07 ± 1.47	9.53 ± 0.53	14.73 ± 0.84	45.78 ± 2.68
Vehicle	7.82 ± 1.78	8.89 ± 0.60	13.42 ± 0.95	41.64 ± 2.79
Xenical	6.83 ± 1.41	8.66 ± 0.32	13.12 ± 0.44	40.78 ± 1.67
CLA	7.73 ± 2.56	9.00 ± 0.84	13.49 ± 1.30	42.47 ± 3.65
50mg/kg	6.20 ± 2.37	8.20 ± 2.01	12.26 ± 3.01	38.47 ± 9.43
100mg/kg	6.76 ± 2.54	9.30 ± 0.78	13.96 ± 1.24	44.02 ± 3.80
200mg/kg	6.78 ± 1.80	9.52 ± 0.41	14.10 ± 0.50	44.32 ± 1.94
400mg/kg	6.43 ± 1.15	8.90 ± 0.25	12.98 ± 0.42	41.94 ± 1.01

	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet (X10 ³ /μL)
Normal Control	48.03 ± 0.48	15.47 ± 0.28	32.20 ± 0.42	842.89 ± 166.59
Vehicle	46.88 ± 0.38	15.09 ± 0.40	32.22 ± 0.78	1036.67 ± 434.40
Xenical	47.08 ± 0.43	15.17 ± 0.24	32.23 ± 0.49	1089.33 ± 290.86
CLA	47.22 ± 0.70	14.99 ± 0.22	31.76 ± 0.48	1107.22 ± 589.56
50mg/kg	46.90 ± 0.39	14.96 ± 0.27	31.88 ± 0.59	863.67 ± 324.48
100mg/kg	47.30 ± 0.78	15.00 ± 0.22	31.69 ± 0.33	913.89 ± 368.35
200mg/kg	46.60 ± 0.68	14.83 ± 0.24	31.83 ± 0.46	878.33 ± 305.80
400mg/kg	47.13 ± 0.70	14.58 ± 0.22	30.96 ± 0.37	950.67 ± 111.13

<표 3-34. 고지방식으로 유도한 DIO I model에서 경단구슬모자반추출물 투여 후 생화학분석 결과>

	Total Cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
Normal control	109.27±7.11	44.64±8.8	67.03±2.06	6.67±1.72
Vehicle	176.37±19.90	109.61±16.7	94.83±2.82	7.59±0.99
Xenical	172.13±23.26	75.95±18.68	90.65±5.30	6.93±0.98
CLA	159.69±29.63	77.01±13.12	88.43±7.33	9.66±2.04
50 mg/kg	161.12±15.38	80.09±19.60	88.60±5.13	6.91±2.40
100 mg/kg	156.78±26.66	70.26±20.93	87.38±9.71	7.38±1.94
200 mg/kg	170.72±29.13	48.98±17.35	90.62±7.28	6.38±2.45
400mg/kg	161.12±14.34	74.28±15.55	94.49±3.93	5.69±1.72



<그림 3-89. 고지방식으로 유발된 마우스의 비만 관련 지표에서의 경단구슬모자반추출물 효과>

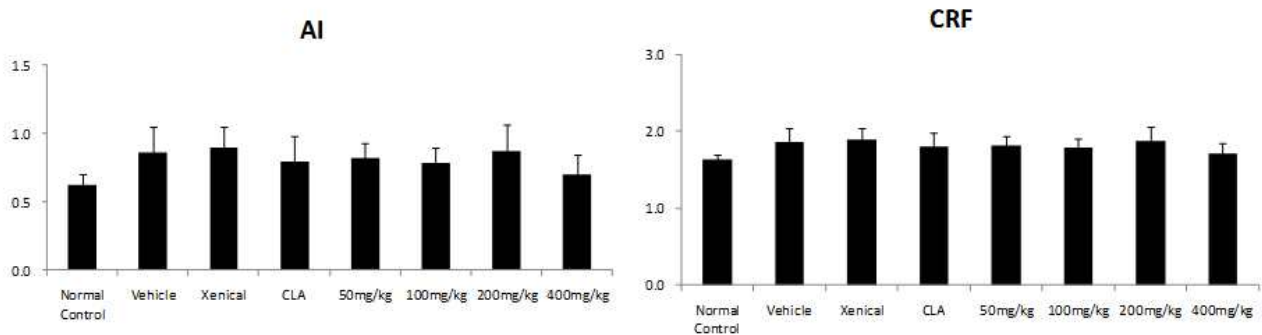
○ 비만으로 인한 심혈관계 질환의 위험도 판정에 이용되는 동맥경화지수(Atherogenic Index, AI)와 심혈관위험지수(Cardiac Risk Factor, CRF)를 다음의 식에 의하여 계산하여 분석하여 본 결과 음성대조군은 각각 0.63±0.07, 1.63±0.07인 반면 양성대조군인 CLA 투여군은 0.79±0.19, 1.79±0.19이었으며 400mg/kg 투여군에서는 0.71±0.14, 1.71±0.14로 음성대조군에 비해 현저한 감소를 나타내어 심혈관계 질환에도 효과가 있을 것으로 예상됨.

- 동맥경화지수(Atherogenic Index, AI), 심혈관위험지수(Cardiac Risk Factor, CRF) 계산식

$$AI = \frac{\text{total cholesterol} - \text{HDL}}{\text{HDL}} \quad CRF = \frac{\text{total cholesterol}}{\text{HDL}}$$

<표 3-35. 고지방식으로 유발된 마우스에서의 동맥경화지수, 심혈관위험지수 분석결과>

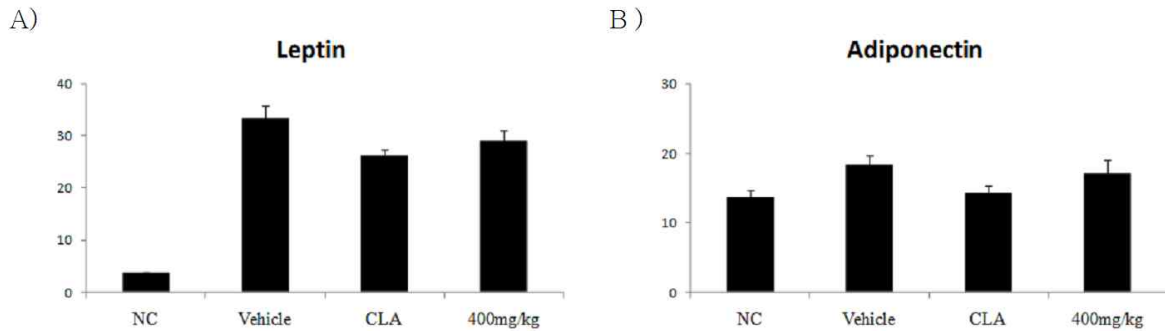
	AI (ratio)	CRF (ratio)
Normal control	0.63±0.07	1.63±0.07
Vehicle	0.86±0.19	1.86±0.19
Xenical	0.89±0.16	1.89±0.16
CLA	0.79±0.19	1.79±0.19
50 mg/kg	0.82±0.11	1.82±0.11
100 mg/kg	0.79±0.11	1.79±0.11
200 mg/kg	0.87±0.19	1.87±0.19
400mg/kg	0.71±0.14	1.71±0.14



<그림 3-90. 고지방식으로 유발된 마우스에서의 심혈관계 질환유발 억제 효능>

(다) 혈중 Leptin, Adiponectin 사이토카인 측정분석

○ 지방세포에서 분비되어 비만에 관여하는 호르몬인 leptin과 adiponectin의 혈중농도를 측정 한 결과, vehicle 투여군에서 leptin과 adiponectin이 발현되는 양에 비해 양성대조군으로 사용 된 CLA와 경단구슬모자반 400mg/kg 투여군에서는 다소 발현양이 감소되는 것으로 확인되었 음 (그림 3-91).

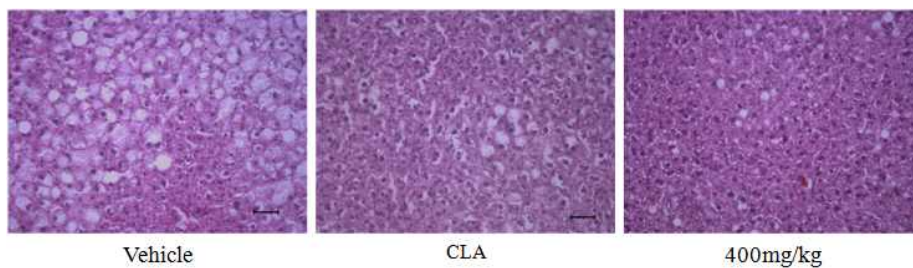


<그림 3-91. 경단구슬모자반 투여군의 Leptin, Adiponectin 합성억제 효과>

(라) 조직분석 결과 (간/지방 H&E 염색 후 현미경분석)

① 간 조직분석 결과

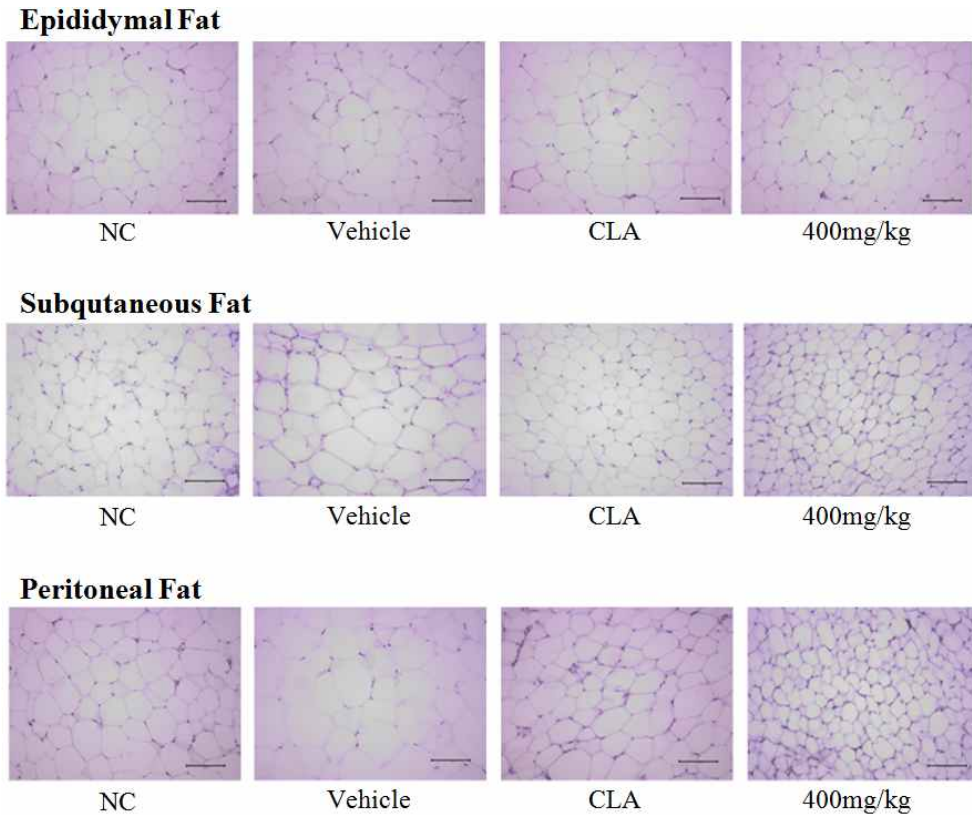
○ 조직병리학적 분석 결과 고지방식이를 유도하면서 vehicle만 투여한 개체군의 간조직에서 는 그림 3-92에서 보여지듯이 지방변성과 괴사, 그리고 vacuolation등이 나타났으나 CLA 투 여군과 경단구슬모자반 400mg/kg 투여군에서는 vehicle 투여군에서 보여지는 간조직의 이상 현상이 현저히 감소됨이 확인되었음.



<그림 3-92. 경단구슬모자반 투여군에서의 H&E 간 조직염색 사진>

② 지방 조직분석 결과

○ 지방조직(Epididymal fat-부고환지방, Subcutaneous fat-피하지방, Peritoneal fat-복막지방)의 조직병리 분석결과 vehicle만 투여한 개체군에서는 각 지방세포별 vacuolation이 과도하게 발생한 것에 비해 경단구슬모자반 400mg/kg 투여군에서 CLA 투여군보다 늘어난 세포면적이 현저히 줄어드는 것을 확인함 (그림 3-93).



<그림 3-93. 부고환지방, 피하지방, 복막지방의 H&E 조직염색사진>

○ 또한 지방조직 내 지방세포의 세포면적을 측정된 결과, vehicle만 투여한 음성대조군에 비해 경단구슬모자반 추출물 400mg/kg 투여군의 세포면적이 감소됨을 확인하였고, 특히 피하지방과 복막지방에서 크게 줄어드는 것이 관찰되었음 (표 3-36).

<표 3-36. 경단구슬모자반 투여군의 지방세포면적 결과>

	Epididymal Fat (x10 ³ mm ²)	Subcutaneous Fat (x10 ³ mm ²)	Peritoneal Fat (x10 ³ mm ²)
Normal control	53.75±9.02	29.14±2.89	52.02±9.76
Vehicle	74.03±4.34	49.34±10.91	115.20±3.67
CLA	74.80±1.16	18.29±1.43	58.17±12.39
400mg/kg	60.63±12.90	22.33±1.09	63.96±10.19

라. DIO II mouse model을 이용한 *in vivo* 항비만 유효성 평가

(1) 실험방법

6주령의 C57BL/6 마우스를 체중이 높은 순으로 배열하고 군 간의 평균과 표준편차가 균등하게 되도록 분리한 이후 6주간 고지방식이(60% 칼로리 지방식이) Harlan사의 멸균된 고형사료(10 kcal% fat)를 통해 체중이 증가 시킨 후 체중이 35g 이상인 마우스만 실험에 사용하였음. 실험군은 정상군, 대조군, positive controls (제니칼 :현재 시판되는 비만치료제, CLA :콜레스테롤 저하 기능을 나타내는 개별인정형 건강기능식품), 표준화된 경단구슬 모자반 60% 주정 추출물을 농도별로 (100, 200, 400) 경구투여 함. 6주간 실험을 진행되었으며 체중은 실험시작 시, 실험경과 3일, 7일, 10일, 14일, 17일, 21일, 24일, 28일, 31일, 35일, 38일, 42일로 총 13회씩 측정하였고 6주간 시료를 투여 후 동물을 희생하여 복부 내장지방과 간을 적출하여 10% Formalin에 고정하여 처리하고, 혈액은 채취하여 혈액분석을 실시함.

<표 3-37. 경단구슬모자반 항비만 유효성 평가 군설정>

Group	Treatment	No. of Mouse
I	정상군	7
II	대조군(비만유발군)	7
III	Xenical 6mg/kg	7
IV	CLA 80mg/kg	7
V	경단구슬모자반 100mg/kg	7
VI	경단구슬모자반 200mg/kg	7
VII	경단구슬모자반 400mg/kg	7

(2) 실험결과

(가) 비만유도 마우스를 이용한 경단구슬모자반 투여군과 대조군의 체중감소 효능비교

○ 6주간 고지방 식이를 통해 체중을 증가시킨 마우스에 6주간 고지방 식이와 함께 경단구슬 모자반 추출물을 농도별로 투여한 결과 vehicle 투여군에서는 7.3g의 체중이 증가한데 비해 경단구슬모자반 추출물을 100mg/kg의 용량으로 투여한 군에서는 6.3g, 200mg/kg 투여군에서 5.4g, 400mg/kg 투여군에서 4.6g의 체중증가로 대조군 (vehicle 투여군)에 비해 체중억제 비율이 13.50%, 26.22%, 37.38%로 좋은 효과가 관찰되었음. (표 3-38), 이는 부고환지방, 피하지방, 복막하지방의 지방량 정량결과와도 비슷한 결과로 나타났으며 경단구슬모자반 400mg/kg 투여군에서 체중감소 및 지방량 감소에 효능이 나타나는 것으로 확인됨 (표 3-39).

<표 3-38. 경단구슬모자반 투여군과 대조군의 체중감소 효과>

Dose	Body Weight(g) (First day)	Body Weight(g) (after 6 weeks)	Change in body weight at end of study (g)	Inhibition rate (%)
Normal control	35.9±1.6	43.2±2.5	7.3	-
Vehicle	29.7±1.6	31.4±1.5	1.7	-
Xenical 6mg/kg	35.5±3.0	39.7±4.4	4.3	41.68
CLA 80mg/kg	35.6±2.5	41.5±4.6	5.9	18.98
100mg/kg	36.0±2.3	42.4±2.8	6.3	13.50
200mg/kg	36.1±2.3	41.4±3.2	5.4	26.22
400mg/kg	35.7±2.8	40.3±3.1	4.6	37.38

<표 3-39. 경단구슬모자반 투여군의 피하지방, 복막하지방, 부고환지방 축적 억제율>

(A) 피하지방 축적 억제율

	Subcutaneous fat weight(g)	Inhibition rate(%)
Normal control	0.30±0.08	-
Vehicle	1.46±0.26	-
Xenical	0.99±0.27	32.2
CLA	1.33±0.30	5.6
100mg/kg	1.58±0.35	-
200mg/kg	1.25±0.39	13.8
400mg/kg	1.08±0.17	25.8

(B) 부고환지방 축적 억제율

	Epididymal fat weight(g)	Inhibition rate(%)
Normal control	0.62±0.12	-
Vehicle	2.4±0.27	-
Xenical	1.94±0.44	19.3
CLA	2.29±0.23	5.0
100mg/kg	2.48±0.16	-
200mg/kg	2.15±0.30	10.5
400mg/kg	2.04±0.57	15.3

(C) 복막하지방 축적 억제율

	Peritoneal fat weight(g)	Inhibition rate(%)
Normal control	0.29±0.08	-
Vehicle	1.07±0.21	-
Xenical	0.83±0.13	22.7
CLA	0.82±0.20	23.8
100mg/kg	1.16±0.24	-
200mg/kg	0.98±0.21	8.1
400mg/kg	0.85±0.12	21.3

(나) 경단구슬모자반 추출물 투여군에서의 혈구수치 및 생화학 수치분석

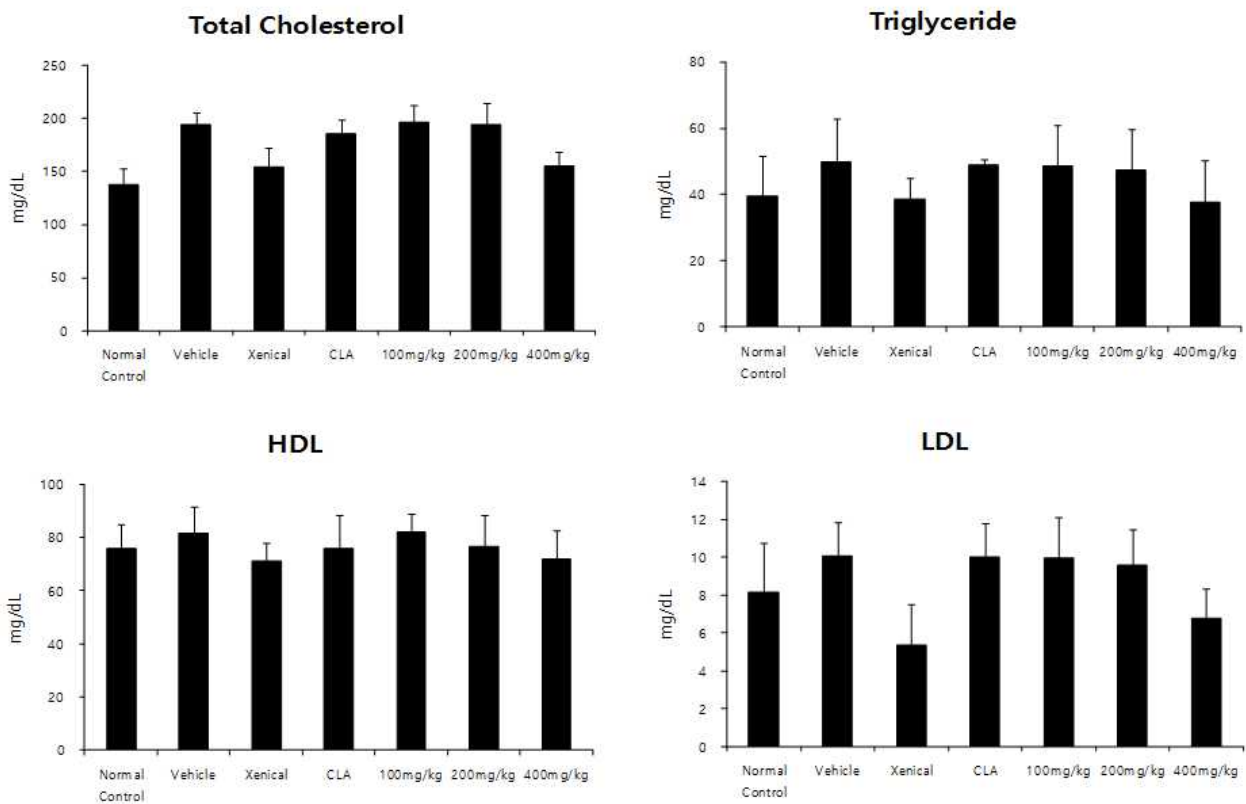
○ 동물을 하룻밤 절식시킨 후 이소플로란 마취하에 개복하여 복대정맥으로부터 채혈한 혈액을 항응고제인 EDTA가 들어있는 채혈병에 넣어 혈구자동계측장치(BECKMAN Coulter, USA)를 이용하여 WBC(white blood cell) count, RBC(red blood cell) count, Hemoglobin, Hematocrit, MCV(mean corpuscular volume), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentraion), Platelet을 측정하였음. 혈구분석 결과 모든 투여군의 검사항목에서 추출물 투여와 관련된 일관성 있는 변화가 관찰되지 않았음 (표 3-40). 이후 혈장을 분리하여 혈액 내 고지혈증의 측정지표항목인 총 콜레스테롤을 분석한 결과 음성대조군 194.55±11.31mg/dl, 양성대조군(Xenical 투여군)에서는 173.85mg/dl인 반면 경단구슬모자반 추출물 400mg/kg 투여군에서는 154.90±16.48로 현저한 감소를 나타내었음 (표 3-41).

<표 3-40. 고지방식으로 유도한 DIO II model에서 경단구슬모자반추출물 투여 후 혈구분석 결과>

	WBC (x10 ³ /uL)	RBC (x10 ⁶ /uL)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)
Normal control	5.11±1.53	9.76±0.69	14.19±0.90	45.14±3.41
Vehicle	4.04±1.53	9.69±0.35	14±0.51	43.97±1.74
Xenical	2.79±1.44	8.82±1.12	12.86±1.26	40.40±3.73
CLA	2.79±1.44	9.35±0.70	13.49±0.89	42.64±2.90
100 mg/kg	2.73±0.70	9.35±0.20	13.51±0.31	42.56±0.63
200 mg/kg	2.63±0.78	8.89±1.35	12.81±1.88	40.16±6.13
400 mg/kg	3.16±1.06	9.35±0.67	13.29±0.96	41.51±3.05
	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Platelet(x10 ³ /uL)
Normal control	46.29±1.03	14.57±0.16	31.47±0.59	1109.86±422.82
Vehicle	45.36±0.68	14.43±0.18	31.81±0.40	996.43±203.98
Xenical	46.05±2.11	14.66±0.63	31.81±0.30	831.50±407.08
CLA	45.64±0.62	14.44±0.30	31.66±0.45	1155.43±166.74
100 mg/kg	45.53±1.05	14.46±0.42	31.76±0.35	1186.14±232.56
200 mg/kg	45.16±1.20	14.40±0.40	31.91±0.32	998.43±307.74
400 mg/kg	44.41±0.80	14.20±0.23	32.00±0.36	1177.57±114.32

<표 3-41. 고지방식으로 유도한 DIO II model에서 경단구슬모자반추출물 투여 후 생화학분석 결과>

	Triglyceride(mg/dL)	Total Cholesterol (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
Normal control	39.37±12.05	137.23±15.90	75.75±9.18	8.17±2.58
Vehicle	49.96±12.75	194.55±11.31	81.67±10.23	10.07±1.76
Xenical	38.52±6.46	173.85±13.29	78.60±10.58	6.68±1.59
CLA	48.75±1.90	174.40±15.59	81.95±11.70	8.31±1.57
100 mg/kg	48.55±12.26	196.06±18.82	82.02±6.74	9.95±2.14
200 mg/kg	47.34±12.25	194.52±13.11	76.79±12.48	9.54±1.77
400 mg/kg	37.63±12.58	154.90±16.48	72.17±7.14	6.76±2.19



<그림 3-94. 고지방식으로 유발된 마우스의 비만 관련 지표에서의 경단구슬모자반추출물 효과>

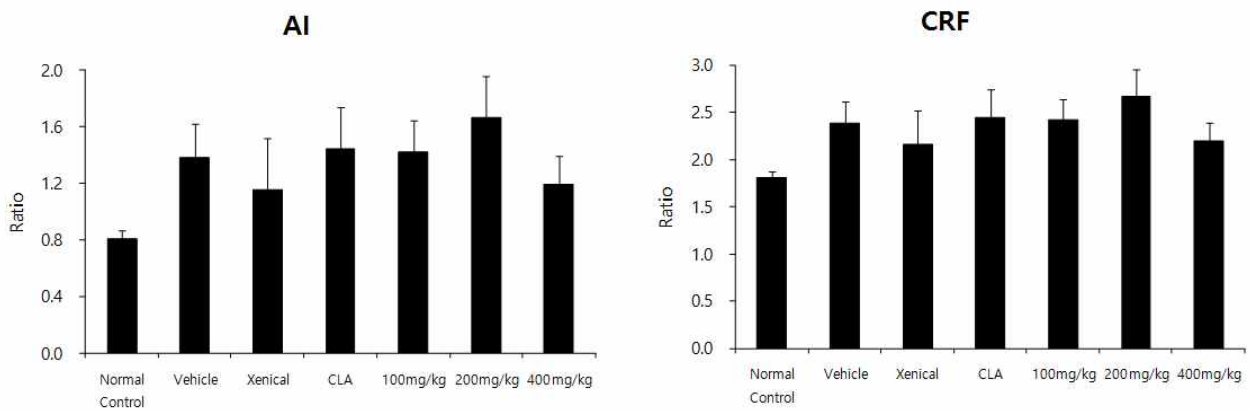
○ 비만으로 인한 심혈관계 질환의 위험도 판정에 이용되는 동맥경화지수(Atherogenic Index, AI)와 심혈관위험지수(Cardiac Risk Factor, CRF)를 다음의 식에 의하여 계산하여 분석하여 본 결과 음성대조군은 각각 1.38±0.23, 2.38±0.23인 반면 경단구슬모자반 추출물 400mg/kg투여군에서는 1.19±0.22, 2.19±0.22로 음성대조군에 비해 감소함(표 3-42, 그림3-95).

- 동맥경화지수(Atherogenic Index, AI), 심혈관위험지수(Cardiac Risk Factor, CRF) 계산식

$$AI = \frac{\text{total cholesterol} - \text{HDL}}{\text{HDL}} \quad CRF = \frac{\text{total cholesterol}}{\text{HDL}}$$

<표 3-42. 고지방식으로 유발된 마우스에서의 동맥경화지수, 심혈관위험지수 분석결과>

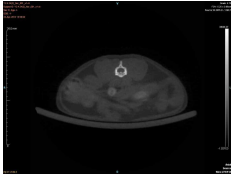
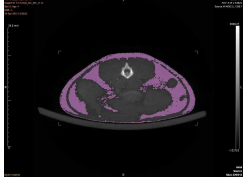

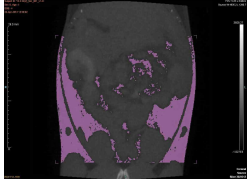
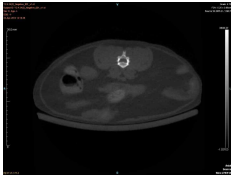
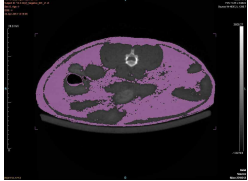
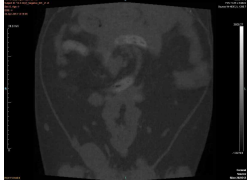
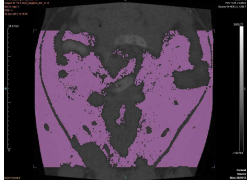
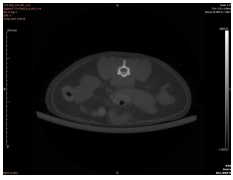
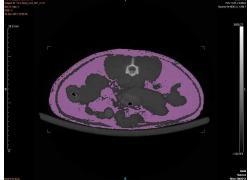
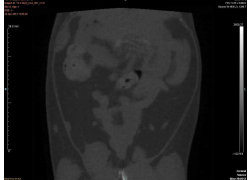
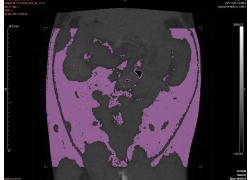
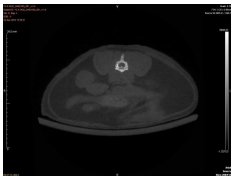
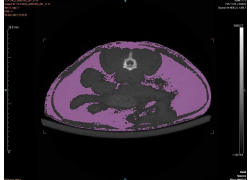
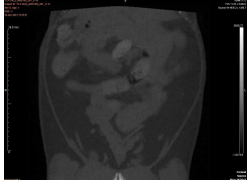
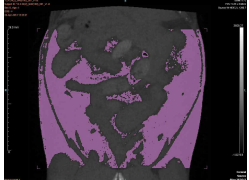
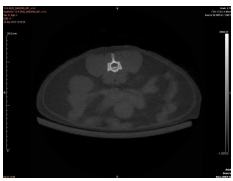
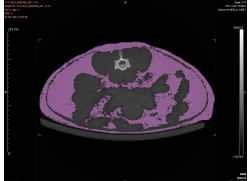
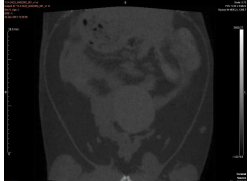
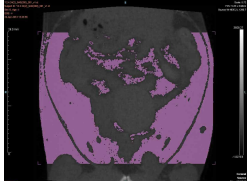
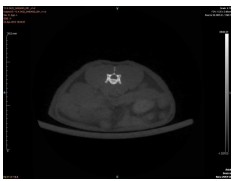
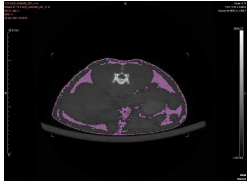
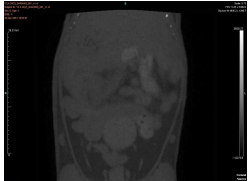
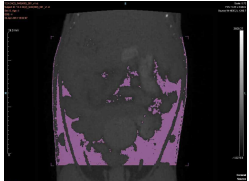
	AI (ratio)	CRF (ratio)
Normal control	0.81 ± 0.05	1.81 ± 0.05
Vehicle	1.38 ± 0.23	2.38 ± 0.23
Xenical	1.26 ± 0.19	2.26 ± 0.19
CLA	1.14 ± 0.29	2.14 ± 0.29
100 mg/kg	1.42 ± 0.36	2.42 ± 0.36
200 mg/kg	1.66 ± 0.29	2.66 ± 0.29
400mg/kg	1.19 ± 0.22	2.19 ± 0.22





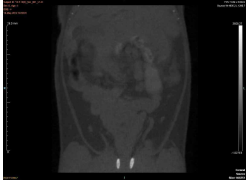
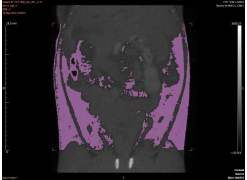
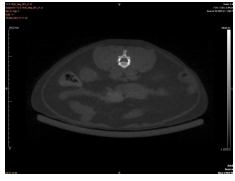
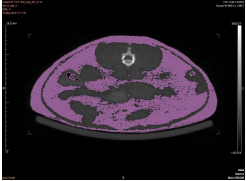
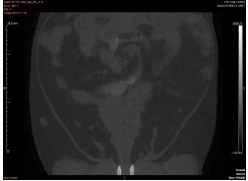
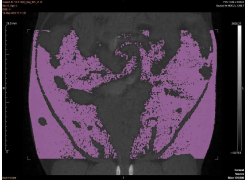
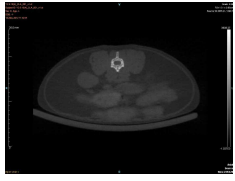
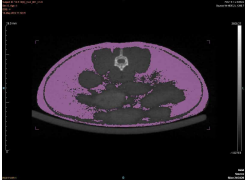
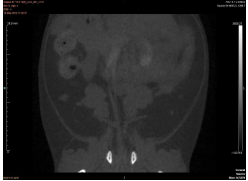
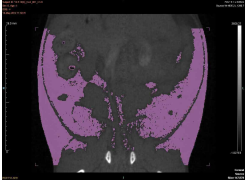
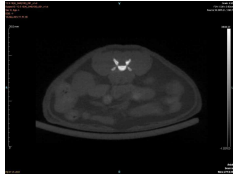
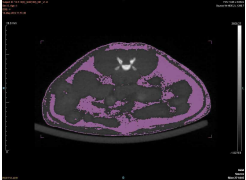
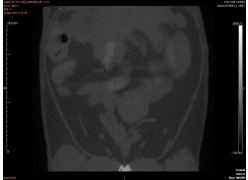

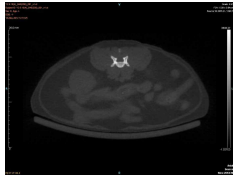
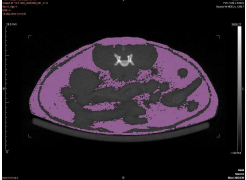
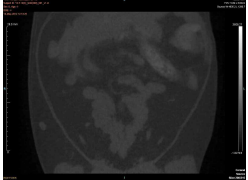
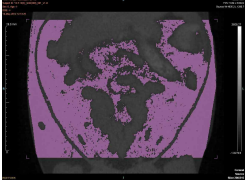
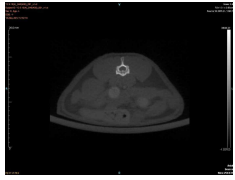
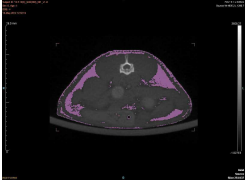

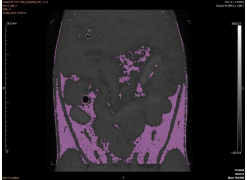
<그림 3-95. 고지방식으로 유발된 마우스에서의 심혈관계 질환유발 억제 효능>

(다) DIO II 비만유도 마우스 모델에서 micro-CT 측정

○ 비만 유도 마우스 모델에서 micro-CT를 통해 마우스의 복부를 촬영하였음. 동물의 복부를 수평면(Axial)과 관상면(Coronal)으로 촬영하여 지방에 해당하는 면적을 보라색으로 표기하였음. 대조군에 비해 경단구슬모자반 처리군에서 지방형성이 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 400mg/kg 용량에서 현저하게 지방형성 억제효과를 확인할 수 있었음.

	Axial		Coronal	
	CT image	복부 지방량	CT image	복부 지방량
Normal				
Vehicle				
CLA				
100 mg/kg				
200 mg/kg				
400 mg/kg				

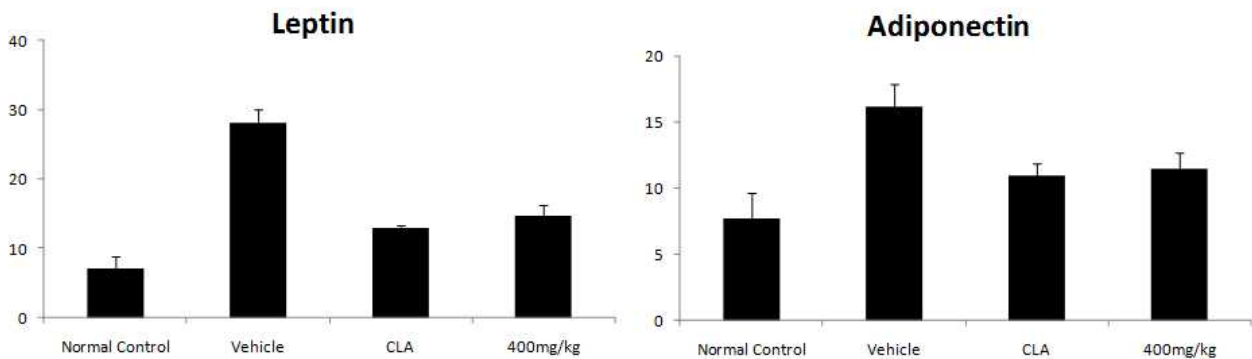
<그림 3-96. 3주후 비만이 유도된 마우스에서의 복부지방 속 Micro CT Image 결과>

	Axial		Coronal	
	CT image	지방량	CT image	지방량
Normal				
Vehicle				
CLA				
100 mg/kg				
200 mg/kg				
400 mg/kg				

<그림 3-97. 6주후 비만이 유도된 마우스에서의 복부지방 속 Micro CT Image 결과>

(라) 혈중 Leptin, Adiponectin 사이토카인 측정분석

○ 지방세포에서 분비되어 지방형성 및 식욕에 관여하는 호르몬인 leptin과 adiponectin의 혈중농도를 측정한 결과, vehicle 투여군에서 leptin과 adiponectin이 발현양이 각각 $28.22 \pm 1.86 \mu\text{g}/\text{ml}$, $16.14 \pm 1.73 \mu\text{g}/\text{ml}$, 양성대조군으로 사용된 CLA 투여군이 $13.10 \pm 0.22 \mu\text{g}/\text{ml}$, $10.95 \pm 0.91 \mu\text{g}/\text{ml}$, 경단구슬모자반 400mg/kg 투여군이 $14.67 \pm 1.63 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 발현양이 다소 감소되는 것으로 확인되었음 (그림 3-98).

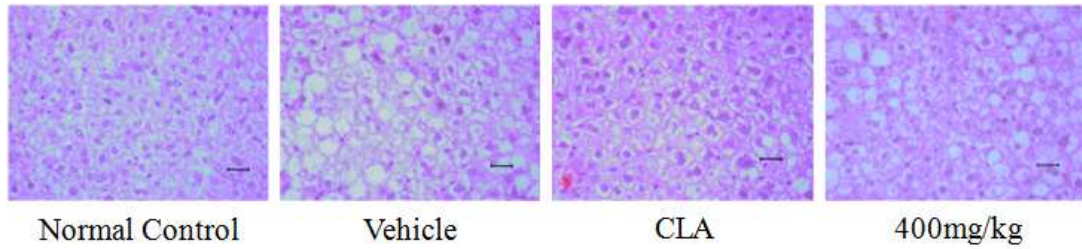


<그림 3-98. 경단구슬모자반 투여군의 leptin, adiponectin 합성억제 효과>

(마) 조직분석 결과 (간/지방 H&E 염색 후 현미경분석)

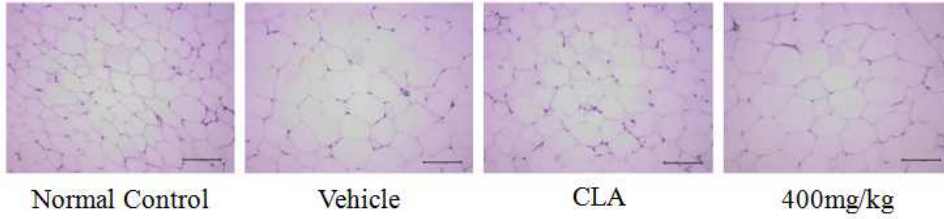
① 간 조직 및 지방조직분석 결과

○ 희생시킨 동물의 간, 각 부위별 지방조직을 적출하여 10% formalin에 5일 동안 고정시킨 후 $4\mu\text{m}$ 두께로 조직 슬라이드를 제작하였음. 조직 슬라이드는 xylene, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% ethanol의 단계로 탈파라핀과 함수과정을 거친 후 hematoxylin과 eosin으로 핵과 세포질을 염색하였고, permount를 이용하여 봉입한 후 현미경으로 관찰함. 비만이 유도된 vehicle군에서는 세포질에 크고 작은 지방 소적으로 인한 지방공포가 관찰되었으며 경단구슬모자반 400mg/kg를 투여한 군에서는 지방공포의 면적도 작아지고 개수도 줄어드는 것이 관찰됨. 또한 지방조직(Peritoneal fat-복막하지방, Subcutaneous fat-피하지방, Epididymal fat-부고환지방)의 분석 결과 비만유도군은 지방세포 면적이 복막하지방 $117.8 \pm 36.6 (X10^3 \text{ mm}^2)$, 피하지방 $41.8 \pm 12.8 \text{ mm}^2$, 부고환지방 $71.0 \pm 13.8 (X10^3 \text{ mm}^2)$ 로 정상군의 복막하지방 $56.8 \pm 19.1 (X10^3 \text{ mm}^2)$, 피하지방 $35.6 \pm 9.9 (X10^3 \text{ mm}^2)$, 부고환지방 $51.5 \pm 7.3 (X10^3 \text{ mm}^2)$ 에 비해 과도하게 확대되어 있는 것을 확인 할 수 있었으며, 경단구슬모자반 400mg/kg 투여군에서는 복막하지방 $49.4 \pm 9.8 (X10^3 \text{ mm}^2)$, 피하지방 $23.6 \pm 4.1 (X10^3 \text{ mm}^2)$, 부고환지방 $74.0 \pm 17.8 (X10^3 \text{ mm}^2)$ 로 지방세포의 비대 현상이 현저하게 억제되는 것으로 나타남.

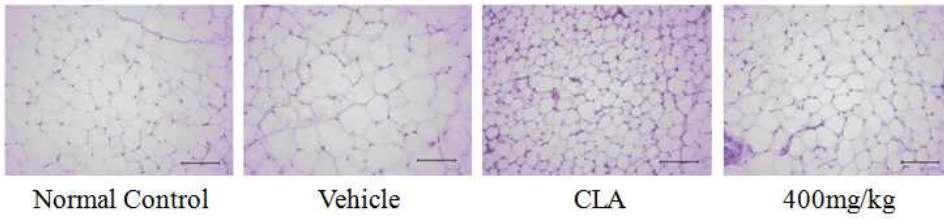


<그림 3-99. 고지방식으로 유발된 마우스의 간조직 H&E 염색 사진>

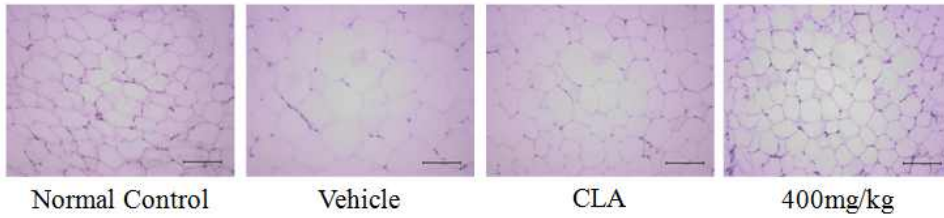
Epididymal Fat



Subcutaneous Fat



Peritoneal Fat



<그림 3-100. 고지방식으로 유발된 마우스의 부고환지방, 피하지방, 복막지방 H&E 염색 사진>

<표 3-43. 고지방식으로 유도한 DIO II model에서 경단구슬모자반 투여군의 지방세포면적>

	Epididymal Fat (X 10³ mm²)	Subcutaneous Fat (X 10³ mm²)	Peritoneal Fat (X 10³ mm²)
Normal Control	51.5 ± 7.3	35.6 ± 9.9	56.8 ± 19.1
Vehicle	71.0 ± 13.8	41.8 ± 12.8	117.8 ± 36.6
CLA	52.9 ± 15.0	14.2 ± 3.1	66.9 ± 23.9
400mg/kg	74.0 ± 17.8	23.6 ± 4.1	49.4 ± 9.8

10. 경단구슬모자반 추출 시료에 대한 동물내 안전성 평가

가. Sprague-Dawley 랫드를 이용한 경단구슬모자반의 단회 경구투여 독성시험

- 한국건설생활환경시험연구원 바이오융합연구소에 안전성 평가를 의뢰하여 경단구슬모자반의 단회 경구투여 독성 시험을 확인하였음 (시험번호 : GT13-00442).
- 동물실험윤리규정에 준수하여 승인을 거쳐 수행되었음 (KCL/ANI/032).



(1) 시험방법

(가) 7주령 SD 랫드를 이용하여 1일간 순화 시킨 후 존데를 통해 당일 오전 중에 단회 경구투여를 통해 경단구슬모자반의 독성을 확인하였음. 시험물질인 경단구슬모자반은 보정 없이 중량 그대로 조제 하였고 멸균증류수에 균일하게 용해 시켜 고용량 (2,000 mg/kg)로 조제한 후 희석하여 저용량 (1,000, 500 mg/kg)로 조제하였음.

(나) 시험물질인 경단구슬모자반의 독성증상과 반수치사량 (LD50, Lethal Dose 50)을 조사하기 위하여 Sprague-Dawley (SD) 계통 암·수 랫드를 이용하여 시험물질을 단회 경구 투여하였음. 부형제 대조군과 3개의 시험군 (500, 1,000 및 2,000 mg/kg)으로 시험을 수행하였으며, 실험기간 동안 일반증상, 체중변화, 통계학적 검정, 동물의 사망 유무 및 실험종료 시 생존동물의 부검소견을 관찰하였음.

(다) 시험군 구성

아래와 같은 실험군으로 단회 투여하고 모든 동물에 대해 매일 1회 일반증상을 관찰하였으며 투여 당일에는 30분 후, 6시간까지 매 시간마다 관찰하고 투여 14일까지 실시함. 체중측정은 모든 동물에 대해 입수 시, 군 분리 시, 투여 전, 투여 후, 1일, 7일 14일, 부검 전에 측정하여 기록함, 투여 14일째 모든 생존 동물은 마취 후 회복하여 장기에 대한 육안적인 부검소견을 관찰하였음.

군	성별	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (ml/kg)	투여용량 (mg/kg)
G1	Male	5	G1-1~G1-5	10	0
	Female	5	G1-21~G1-25		
G2	Male	5	G2-6~G2-10	10	500
	Female	5	G2-26~G2-30		
G3	Male	5	G3-11~G3-15	10	1,000
	Female	5	G3-31~G3-35		
G4	Male	5	G4-16~G4-20	10	2,000
	Female	5	G4-36~G4-40		

G1 :부형제 대조군, G2~G4 : 시험물질 투여군

(라) 시험 및 관찰 항목

일반증상관찰, 체중측정, 부검

(2) 시험결과

(가) 일반증상 관찰 및 사망 동물 측정 : 단회 투여 독성 시험 결과 실험기간 동안 사망동물 및 특이한 일반증상은 관찰되지 않았음.

(나) 체중측정 : 모든 동물에서 정상적인 체중증가가 관찰되었으며, 시험군간 통계학적으로 유의한 변화는 관찰되지 않았음.

(다) 부검 : 실험종료 시 모든 생존동물의 부검결과, 특이한 육안소견은 관찰되지 않았음.

(라) 최종 결과 : 본 시험조건에서 시험물질인 경단구슬모자반 추출물의 반수치사량 (LD50, Lethal Dose 50)은 > 2,000 mg/kg b.w.으로 사료됨.

<표 3-44. Mortalities and clinical sign of rats>

SUMMARY OF MORTALITIES AND CLINICAL SIGNS					
STUDY : GT13-00442		SEX : MALE			
		GROUP(mg/kg)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
MORTALITIES	N	0/5	0/5	0/5	0/5
	%	0	0	0	0
CLINICAL SIGNS	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
		SEX : FEMALE			
		GROUP(mg/kg)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
MORTALITIES	N	0/5	0/5	0/5	0/5
	%	0	0	0	0
CLINICAL SIGNS	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5

Number of animals with the signs / Number of animals examined

<표 3-45. Body weight changes of rats>

SUMMARY OF BODY WEIGHT CHANGES(g)							
STUDY : GT13-00442				SEX : MALE			
Day	GROUP(mg/kg)						
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)	G3(1,000)	G2(500)	G1(0)
0	233.91 ± 7.91 (5)	231.63 ± 7.45 (5)	231.77 ± 7.05 (5)	232.71 ± 6.75 (5)	231.77 ± 7.05 (5)	231.63 ± 7.45 (5)	233.91 ± 7.91 (5)
1	260.90 ± 7.74 (5)	264.79 ± 7.36 (5)	262.53 ± 7.01 (5)	260.25 ± 7.85 (5)	262.53 ± 7.01 (5)	264.79 ± 7.36 (5)	260.90 ± 7.74 (5)
7	294.60 ± 13.99 (5)	298.68 ± 7.94 (5)	301.23 ± 12.96 (5)	294.96 ± 15.74 (5)	301.23 ± 12.96 (5)	298.68 ± 7.94 (5)	294.60 ± 13.99 (5)
14	333.49 ± 19.57 (5)	341.04 ± 11.03 (5)	345.27 ± 17.46 (5)	334.55 ± 22.05 (5)	345.27 ± 17.46 (5)	341.04 ± 11.03 (5)	333.49 ± 19.57 (5)

SEX : FEMALE							
Day	GROUP(mg/kg)						
	G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)	G3(1,000)	G2(500)	G1(0)
0	184.57 ± 5.74 (5)	186.14 ± 5.31 (5)	186.41 ± 8.64 (5)	184.65 ± 4.74 (5)	186.41 ± 8.64 (5)	186.14 ± 5.31 (5)	184.57 ± 5.74 (5)
1	205.71 ± 5.65 (5)	204.60 ± 7.55 (5)	203.75 ± 9.51 (5)	202.84 ± 5.46 (5)	203.75 ± 9.51 (5)	204.60 ± 7.55 (5)	205.71 ± 5.65 (5)
7	218.79 ± 7.36 (5)	218.28 ± 6.76 (5)	213.16 ± 17.29 (5)	218.62 ± 9.69 (5)	213.16 ± 17.29 (5)	218.28 ± 6.76 (5)	218.79 ± 7.36 (5)
14	227.01 ± 16.95 (5)	235.55 ± 8.15 (5)	226.24 ± 18.86 (5)	233.49 ± 12.84 (5)	226.24 ± 18.86 (5)	235.55 ± 8.15 (5)	227.01 ± 16.95 (5)

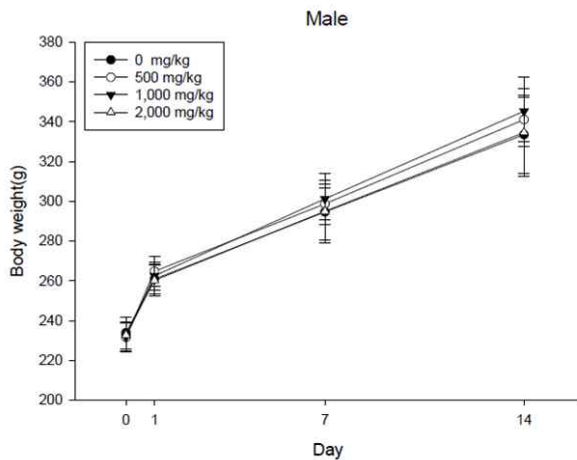
Mean±S.D (Number of animals)

<표 3-46. Cross findings of rats>

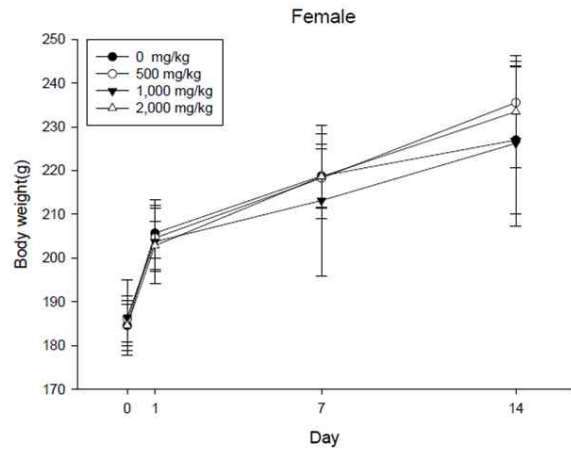
SUMMARY OF GROSS FINDINGS					
STUDY : GT13-00442		SEX : MALE			
ORGAN	SIGN	GROUP(mg/kg)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
All organs	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5

		SEX : FEMALE			
ORGAN	SIGN	GROUP(mg/kg)			
		G1(0)	G2(500)	G3(1,000)	G4(2,000)
All organs	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5

Number of animals with the signs / Number of animals examined



<그림 3-101.
Body weight changes of male rat>

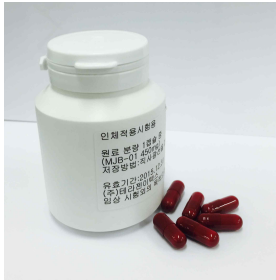


<그림 3-102.
Body weight changes of female rat>

11. 제형 연구 및 시제품 제작

가. 시제품 제형 개발

(1) 캡슐 제형 : 원활한 인체적용시험을 위한 시제품으로 경단구슬모자반 원료가 가지는 효능을 최대한 정확하게 측정하기 위해 일부의 부형제와 함께 캡슐형태의 제형 선택



<그림 3-103. 인체적용 시험을 위한 시제품 사진>

(2) 인체적용시험을 위한 캡슐 시제품 제작

<표 3-47. 캡슐 시제품 제작>

원료명	시제품 1 (1.25g/1일)		시제품 2 (2.5g/1일)		시제품 3 (대조식품)	
	1 캡슐 중 (mg)	함유율 (%)	1 캡슐 중 (mg)	함유율 (%)	1 캡슐 중 (mg)	함유율 (%)
경단구슬모자반 주정 추출물	208.3	46.3	416.7	92.6	223.5 (유당)	49.7
옥수수 전분	237.2	52.7	28.8	6.4	222.0	49.3
스테아르산마그네슘	4.5	1.0	4.5	1.0	4.5	1.0
합계	450	100	450	100	450	100

(2) 향후 소비자의 기호도에 맞는 음료나 과립 형태의 2차 제형 모색도 가능

12. 인체적용시험

가. 인체적용시험 명칭 및 시험번호

- (1) 제목 : 비만 또는 과체중 대상자에서 “MJB-01” 복용의 체중감량 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조, 용량반응탐색 예비 인체적용시험
- (2) 시험번호 : 2014-MJB-01

나. 인체적용시험 실시기관 : 충북 소재 S 병원

다. 목적

- (1) 1차 목적 : 비만 또는 과체중 대상자에서 MJB-01의 체중감량 기능성 및 안전성을 평가하고자 함.
- (2) 2차 목적 : 비만 또는 과체중 대상자에서 MJB-01을 용량별로 투여하고 투여 전후의 체중감량 변화를 통하여 유효한 용량을 결정하고자 함.

라. 연구 대상 및 대상자수

- (1) 연구대상 : 만 19세에서 만 60세 미만의 BMI $25\text{kg}/\text{m}^2$ 이상 $29.9\text{kg}/\text{m}^2$ 이하의 남성 및 비임신 여성
- (2) 대상자수 : 30명 (MJB-01 2.5G군 : 10명, MJB-01 1.25G군 : 10명, 대조군 : 10명)
20%의 탈락율 고려하여 12명으로 총 36명으로 실험 실시, MJB-01 1.25G군에서 중도 탈락하여 35명 시험 완료

마. 투여 물질 및 방법, 기간

- (1) 투여 물질 : 인체적용시험용 제작된 시제품, 대조군
- (2) 투여 방법 : 아침, 저녁 총 2회 식전 30분에 3캡슐씩 하루 총 6캡슐 경구 투여
- (3) 투여 기간 : 12주

바. 평가 방법

- (1) 기능성
 - (가) 1차 기능성 평가 : 체중감소율
 - (나) 2차 기능성 평가
 - ① DEXA를 통한 체지방 감소치
 - ② 체중 감소치
 - ③ 체질량지수(BMI) 감소율
 - ④ 체질량지수(BMI) 감소치

- ⑤ 허리/엉덩이 둘레(W/H ratio) 감소치
- ⑥ 허리둘레 감소치
- ⑦ 엉덩이 둘레 감소치
- ⑧ 혈청지질 (Total cholesterol, LDL, HDL)감소치
- ⑨ 혈청지질 (Total cholesterol, LDL, HDL) 감소율

(2) 안전성

(가) 인체적용시험용 식품 복용 전과 복용중, 복용 12주 후에 실험실 검사 및 활력 징후 측정을 실시하고 연구기간동안 이상반응 평가

사. 인체적용시험 결과

(가) MJB 2.5G, 1.25G 및 대조약물을 BMI 25이상 29.9 이하의 성인에게 12주간 투여한 결과, 통계적으로 유의성은 적었으나 대조군에 비해 체지방 및 체중을 감소시켰고 용량이 높을수록 체지방 감소 효과가 나타났음.

(나) 복용 12주 후 체중 변화는 통계학적 유효성은 경계선상에 있으나 경단구슬모자반 주중 추출물 용량이 높은 군 (2.5g/1일)에서 체중 변화가 더 크게 나타났음

(다) 안전성에서 12주 복용기간 동안 시험식품과 관련된 이상반응은 소화불량 등이 있었고 중대하거나 치료를 요하는 이상반응이 나타나지 않았으므로 안전성을 확인할 수 있었음. 또한 활력증후 및 혈액학적 검사에서도 이상소견이 나타나지 않았으므로 안전하게 사용할 수 있을 것으로 판단됨.

*별첨

(1) IRB 승인 및 인체적용시험 계획

<h1>인 체 적 용 시 험 계 획 서</h1>	
<p>비만 또는 과체중 대상자에서 "MJB-01"복용의 체중감량 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 용량반응탐색 예비인체적용시험</p> <p>A Single-center, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Preliminary Study for the efficacy and safety of "MJB-01" in the Obese Patients or overweight</p>	
시험계획서번호	2014-MJB-01
버전(작성일)	1.1 (2014.03.25)
실시기관	
의뢰자	
임상시험수탁기관	

기 밀 문 서

본 인체적용시험계획서는 기밀 사항입니다.
본 인체적용시험계획서는 적합한 인체적용시험책임자 및 인체적용시험담당자, 임상시험심사위원회와
식품의약품안전처에 비밀을 유지하는 조건으로 공개되는 경우를 제외하고는 ㈜테라젠이텍스의 사전
서면 동의 없이 미발표 상태의 정보가 발표되거나 공개될 수 없음에 동의함으로써 승인되었습니다.

◆인체적용시험계획서 개요

인체적용시험 제 목	비만 또는 과체중 대상자에서 "MJB-01"복용의 제중감량 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 용량반응탐색 예비인체적용시험
시 험 책 임 자	
실 시 기 관	
의 려 자	
인체적용시험 목 적	1차 목적: 비만 또는 과체중 대상자에서 MJB-01의 제중감량 기능성 및 안전성 평가 2차 목적: 비만 또는 과체중 대상자에서 MJB-01을 용량별로 투여하고 투여 전후의 제중 감량 변화를 통한 유효한 용량 결정
시 험 설 계	단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 용량반응탐색 예비인체적용시험
대 상 자 수	최종 평가가능 예수 30 예 (시험A군: 10예, 시험B군: 10예, 위약군 10예), 20%의 탈락을 고려 시 군당 12예, 총 36예
연 구 대 상	만 19세 이상 만 60세 미만의 BMI 25kg/m ² 이상 29.9kg/m ² 이하의 남성 또는 비임신 여성
시 험 식 품 명	<ul style="list-style-type: none"> 시험용량 1군: MJB-01 1.25g/일 시험용량 2군: MJB-01 2.5g/일
대 조 식 품 명	<ul style="list-style-type: none"> 대조군: MJB-01 0g/일
투 여 방 법 및 투 여 기 간	인체적용시험 식물을 아침, 저녁 총 2회 식전 30분에 3캡슐씩 하루 총 6캡슐을 12주간 경구 투여한다.
시 험 기 간	각 대상자 별로 총 14주(스크리닝 2주, 약제투여기간 12주)가 소요되며 전체 36명의 대상 지원자를 모집하는데 필요한 기간은 약 8주 이상 예상되며, 총 인체적용시험 실시기간은 최초 모집시점으로부터 22주 이상 소요될 것으로 예상된다.
선 정 기 준	<p>선정기준 (대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다)</p> <ol style="list-style-type: none"> 만 19세 이상 만 60세 미만의 남, 여 비만 진단: BMI 25 kg/m² 이상 29.9 kg/m² 이하인 비만 대상자 열량제한, 운동 등의 제중감량 프로그램 등 관리에 실패한 과체중자 인체적용시험동의서에 서면 동의한 대상자
제 외 기 준	<p>제외기준 (다음조건에 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없다)</p> <ol style="list-style-type: none"> 해조류에 과민증 또는 그 병력이 있는 대상자 고혈압 약물을 복용 중임에도 불구하고 수축기 혈압이 140mmHg 이상이거나 이완기 혈압이 90mmHg 이상인 자 또는 고혈압 치료제 중 베타차단

	<p>제나 이노제를 복용중인 자</p> <p>3) 고지혈증으로 진단받아 약물을 복용 중인 자</p> <p>4) 갑상선 기능 저하증, 쿠싱 증후군 등의 내분비질환으로 인한 비만 대상자</p> <p>5) 우울증, 식사장애, 정신분열증, 알코올중독증, 약물중독 등의 신경 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 질환을 앓고 있는 환자</p> <p>6) 당뇨병, 위장관계 질환(위궤양, 십이지장궤양 등) 및 설사(역상 또는 역상에 가까운 대변을 부정시에 배출하는 것) 등의 대사질환, 통풍, 포르피리아가 현재 진행중인 환자</p> <p>7) 혈청 내 간수지(ALT, AST, r-GT)가 정상의 상한선보다 2.5배 이상인 경우</p> <p>8) 혈청 creatinine 수치가 2.0mg/dl 이상인 경우</p> <p>9) 스크리닝 이전 3개월 이내에 비만치료제(흡수저해제 및 식욕억제제) 및 항우울제, 피임약, 경구용 스테로이드제제, 암페타민, 페노다이하진, 싸이프로헵타딘, 여성호르몬제 등의 체중에 영향을 줄 수 있는 약제를 복용한 경우</p> <p>10) 스크리닝 이전 3개월 이내에 5% 이상의 의도적인 체중감소가 있었던 자</p> <p>11) 스크리닝 이전 6개월 이내에 체중감량을 위해 위성형, 장관절제 등의 수술이나 기타 외과적 수술의 경험이 있는 대상자</p> <p>12) 스크리닝 이전 6개월 이내에 심질환(심부전, 협심증, 심근경색, 관상동맥 우회로술, 혈관확장술)이 있는 환자</p> <p>13) 스크리닝 이전 5년 이내 악성 종양 진단 및 치료를 받은 적이 있는 환자</p> <p>14) 임부 또는 수유부이거나 시험기간 중 효과적인 피임방법을 사용할 것을 동의하지 않은 가임기 여성(단, 경구용 피임제의 복용은 불가)</p> <p>15) 최근 3개월 이내에 다른 임상시험에 참여한 경험이 있는 환자</p> <p>16) 심한 근골격계 질환으로 운동을 할 수 없을 것으로 판단되는 경우</p> <p>17) 담당자의 소견으로 볼 때, 인체적용시험 참여에 부적합하다고 판단한 자</p>												
<p>시 험 방 법</p>	<p>대상자가 인체적용시험에 참여할 것을 서면으로 동의하면, 계획서에 따라 필요한 검진 및 검사를 실시한 후, 대상자 적합성 평가결과, 선정기준에 적절한 대상자에 한하여 무작위 배정된다.</p> <p>무작위 배정된 대상자는 12주간 시험식품 또는 대조식품을 복용하게 된다.</p> <table border="1" data-bbox="507 1489 1300 1646"> <tr> <td>방문 1 (D-14)</td> <td>방문 2 (D0)</td> <td>방문 3 (D42±5)</td> <td>방문 4 (D84±5)</td> </tr> <tr> <td>스크리닝 방문</td> <td>무작위배정방문</td> <td>중간방문</td> <td>종료방문</td> </tr> <tr> <td colspan="4" style="text-align: center;">복 용</td> </tr> </table>	방문 1 (D-14)	방문 2 (D0)	방문 3 (D42±5)	방문 4 (D84±5)	스크리닝 방문	무작위배정방문	중간방문	종료방문	복 용			
방문 1 (D-14)	방문 2 (D0)	방문 3 (D42±5)	방문 4 (D84±5)										
스크리닝 방문	무작위배정방문	중간방문	종료방문										
복 용													
<p>기 능 성 평 가</p>	<p>① 1차 기능성 평가 (Primary endpoint):</p> <ul style="list-style-type: none"> • 체중 감소율 <p>② 2차 기능성 평가 (Secondary endpoint):</p> <ul style="list-style-type: none"> • DEXA를 통한 체지방(Fat%) 감소지 • 체중 감소지 												

	<ul style="list-style-type: none">• 체질량지수(BMI) 감소율• 체질량지수(BMI) 감소치• 허리/엉덩이 둘레(W/H ratio) 감소치• 허리 둘레 감소치• 엉덩이 둘레 감소치• 혈청지질(Total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, Triglyceride) 감소치• 혈청지질(Total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, Triglyceride) 감소율
안 전 성 평 가	인체적용시험 식품 복용 전과 복용 중, 복용 12주 후에 실험실적 검사 및 활력징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가한다.



심사결과 통보서

수 신	책임연구자				
	의뢰 기관				
IRB No.	2014-05	Protocol No.	2014-MJB-01	Version No.	1.0
연구과제명	비만 또는 과체중 대상자에서 "MJB-01"복용의 체중감량 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 용량반응 탐색 예비 인체적용시험				
연구종류 및 대상	<input type="checkbox"/> 유전자관련 <input type="checkbox"/> 보관된 검체연구 <input type="checkbox"/> 조직 및 혈액연구 <input type="checkbox"/> 의료행위 <input type="checkbox"/> 의무기록을 이용한 환자군 연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 관찰연구 <input type="checkbox"/> 기타()				
	<input checked="" type="checkbox"/> 임상시험 (<input type="checkbox"/> 의약(외)품 <input type="checkbox"/> 의료기기 <input checked="" type="checkbox"/> 건가식 <input type="checkbox"/> 화장품 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제)				
	일반명	경단구슬모자반주정추출물	상품명		
	연구용도	<input type="checkbox"/> 학술용 <input checked="" type="checkbox"/> 국내 허가용(KFDA) <input type="checkbox"/> 해외 허가용(국가명:)			
Phase	<input type="checkbox"/> 제1상 <input type="checkbox"/> 제2상 <input type="checkbox"/> 제3상 <input type="checkbox"/> 제4상 <input type="checkbox"/> PMS <input type="checkbox"/> 학술연구 <input checked="" type="checkbox"/> 기타				
피험자수	36 명 (본 기관 배정)		36 명		
제출서류	<input checked="" type="checkbox"/> 임상시험 심사의뢰서		<input checked="" type="checkbox"/> 대상자에게 제공되는 정보 (해당하는 경우)		
	<input checked="" type="checkbox"/> 연구계획서 (Protocol)		<input checked="" type="checkbox"/> 대상자에게 제공되는 보상에 대한 정보		
	<input checked="" type="checkbox"/> 계획서 요약 (Synopsis)		<input type="checkbox"/> 대상자 모집관련 서류 (공고문, 매체 정보)		
	<input checked="" type="checkbox"/> 중례기록서 (CRF)		<input checked="" type="checkbox"/> 이해상충서약서(연구책임자 및 연구자)		
	<input checked="" type="checkbox"/> 대상자 동의서		<input checked="" type="checkbox"/> 임상시험자 자료집 (해당하는 경우)		
	<input checked="" type="checkbox"/> 안전성 정보		<input type="checkbox"/> 식약청이나 공모기관의 신청서 또는 승인서 (해당되는 경우)		
<input checked="" type="checkbox"/> 연구책임자의 CV					
심사종류	<input checked="" type="checkbox"/> 초기심사 <input type="checkbox"/> 재심사 <input type="checkbox"/> 신속심사 <input type="checkbox"/> 기타				
관련근거	심사회의록	심사일자	2014년 3월 14일	승인일자	2014년 3월 20일
심사결과	<input type="checkbox"/> 승인 <input checked="" type="checkbox"/> 시정승인 <input type="checkbox"/> 보완 <input type="checkbox"/> 반려 <input type="checkbox"/> 중지 <input type="checkbox"/> 부결				
연구승인기간	2014년 03월 20일 ~ 2015년 03월 19일 까지				
정기보고주기	<input type="checkbox"/> 3개월 <input type="checkbox"/> 6개월 <input checked="" type="checkbox"/> 1년 <input type="checkbox"/> 기타 ()				
	정기보고주기는 1년을 초과할 수 없음				
심사결과내용	<p>상기 과제의 연구계획서 및 제출된 서류를 정식심사에서 검토한 결과, 효과 및 안전성이 완전히 입증되지 않은 시험제품으로 인한 잠재적인 부작용이 예상되지만 대상자에게 부가되는 위험은 최소위험을 상회하지 않고, 대상자에게 기대되는 직견이익이 위험을 상회하는 것으로 판단합니다. 투표에 참여한 위원 7명 중 3명이 "승인"에 찬성, 4명이 "시정승인"에 찬성하여 본 과제의 최종 심사 의견을 "시정승인"으로 결정하며, 심사회의록의 내용을 시정해 제출하시기 바랍니다.</p>				
※ 보완을 요구하는 "보완", "시정 승인"시에는 보완서류를 1주일 이내에 제출하시기 바랍니다.					



인 체 적 용 시 험 결 과 보 고 서

Clinical Study Report

비만 또는 과체중 대상자에서 “MJB-01”복용의 체중감량 기능성 및 안전성을
평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 용량반응탐색
예비인체적용시험

A Single-center, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Preliminary Study
for the efficacy and safety of “MJB-01” in the Obese Patients or overweight

2014년 10월 14일

CONFIDENTIAL

본 최종보고서와 관련된 정보는 기밀사항입니다

본 시험결과보고서는 ; 의 재산으로 기밀 서류
입니다. 수용한다는 것은 공개적으로는 가용하지 않으나 여기에 포함되어 있는 정보를 본 시험을
보고하기 위한 심사위원회(IRB) 또는 윤리위원회에서의 사용을 제외하고는 누설하지 않겠다는데
대한 동의를 의미합니다. IRB에게는 비밀의 유지가 요구되며 또 기대됩니다. 위 회사의 동의 없이
는 본 자료를 전체 또는 부분적으로 사용하거나 발표할 수 없습니다.

◆인체적용시험계획서 개요

인체적용시험 제목	비만 또는 과체중 대상자에서 "MJB-01"복용의 제중감량 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 용량반응탐색 예비인체적용시험
시험책임자	
실시기관	
의뢰자	
인체적용시험 목적	1차 목적: 비만 또는 과체중 대상자에서 MJB-01의 제중감량 기능성 및 안전성 평가 2차 목적: 비만 또는 과체중 대상자에서 MJB-01을 용량별로 투여하고 투여 전후의 제중 감량 변화를 통한 유효한 용량 결정
시험설계	단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 용량반응탐색 예비인체적용시험
대상자수	최종 평가가능 예수 30 예 (시험A군: 10예, 시험B군: 10예, 위약군 10예), 20%의 탈락을 고려 시 군당 12예, 총 36예
연구대상	만 19세 이상 만 60세 미만의 BMI 25kg/m ² 이상 29.9kg/m ² 이하의 남성 또는 비임신 여성
시험식품명	<ul style="list-style-type: none"> 시험용량 1군: MJB-01 1.25g/일 시험용량 2군: MJB-01 2.5g/일
대조식품명	<ul style="list-style-type: none"> 대조군: MJB-01 0g/일
투여방법 및 투여기간	인체적용시험 식품을 아침, 저녁 총 2회 식전 30분에 3캡슐씩 하루 총 6캡슐을 12주간 경구 투여한다.
시험기간	각 대상자 별로 총 14주(스크리닝 2주, 약제투여기간 12주)가 소요되며 전체 36명의 대상 지원자를 모집하는데 필요한 기간은 약 8주 이상 예상되며, 총 인체적용시험 실시기간은 최초 모집시점으로부터 22주 이상 소요될 것으로 예상된다.
선정기준	<p>선정기준 (대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 한다)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 만 19세 이상 만 60세 미만의 남, 여 2) 비만 진단: BMI 25 kg/m² 이상 29.9 kg/m² 이하인 비만 대상자 3) 열량제한, 운동 등의 제중감량 프로그램 등 관리에 실패한 과체중자 4) 인체적용시험동의서에 서면 동의한 대상자
제외기준	<p>제외기준 (다음조건에 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없다)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 해조류에 과민증 또는 그 병력이 있는 대상자 2) 고혈압 약물을 복용 중임에도 불구하고 수축기 혈압이 140mmHg 이상이거나 이완기 혈압이 90mmHg 이상인 자 또는 고혈압 치료제 중 베타차단

CLINICAL STUDY REPORT

인체적용시험 제목 (Study Title)	비만 또는 과체중 대상자에서 "MJB-01" 복용의 체중감량 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 용량반응탐색 예비인체적용시험
인체적용시험 식품 (Investigational Product)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 시험식품: 경단구슬모자반주정추출물(MJB-01) ▪ 대조식품: Placebo)
인체적용시험 디자인 (Study Design)	단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 용량반응탐색 예비인체적용시험
인체적용시험 책임자 (Principal Investigator)	
인체적용시험 공동연구자 (Sub Investigator)	
인체적용시험 실시기관	
의뢰자 (Name of Sponsor)	
의뢰자의 담당자 (Contact at Sponsor)	
IRB 승인일 (IRB Approval Date)	최초/1차 변경 승인: 2014년 03월 31일 2차 변경: 2014년 06월 23일 3차 변경: 2014년 07월 28일
인체적용시험 시작일 (Study Initiation Date)	2014년 04월 07일 (First patient screened)
인체적용시험 종료일 (Study Completion Date)	2014년 07월 09일 (Last patient completed)

❖ 요약

인체적용시험의 명칭	비만 또는 과체중 대상자에서 "MJB-01"복용의 체중감량 기능성 및 안전성을 평가하기 위한 단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 용량반응탐색 예비인체적용시험
인체적용시험 책임자	
인체적용시험 실시기관	
인체적용시험의 목적	1차 목적: 비만 또는 과체중 대상자에서 MJB-01의 체중감량 기능성 및 안전성을 평가하고자 하였다. 2차 목적: 비만 또는 과체중 대상자에서 MJB-01을 용량별로 투여하고 투여 전후의 체중 감량 변화를 통하여 유효한 용량을 결정하고자 하였다.
시험설계	단일기관, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 용량반응탐색 예비인체적용시험
대상자수	최종 평가가능 예수 30명(MJB2.5G군: 10명, MJB1.25G군: 10명, 대조군: 10명), 20%의 탈락을 고려 시 군당 12명으로 총 36명이었으며, MJB2.5G군에 12명, MJB1.25G군에 12명, 대조군에 12명이 등재 되었으나, MJB1.25G군에서 1명 중도탈락하여 전체 35명이 인체적용시험을 완료하였다.
연구대상	만 19 세 이상 만 60 세 미만의 BMI 25kg/m ² 이상 29.9kg/m ² 이하의 남성 또는 비임신 여성
선정기준	<u>선정기준</u> (대상자들은 다음의 모든 기준에 적합하여야 했다.) 1) 만 19세 이상 만 60세 미만의 남, 여 2) 비만 진단: BMI 25 kg/m ² 이상 29.9 kg/m ² 이하인 비만 대상자 3) 열량제한, 운동 등의 체중감량 프로그램 등 관리에 실패한 과체중자 4) 인체적용시험동의서에 서면 동의한 대상자
제외기준	<u>제외기준</u> (다음 조건에 하나라도 해당되는 대상자는 본 연구에 참여할 수 없었다.) 1) 해조류에 과민증 또는 그 병력이 있는 대상자 2) 고혈압 약물을 복용 중임에도 불구하고 수축기 혈압이 140mmHg 이상이거나 이완기 혈압이 90mmHg 이상인 자 또는 고혈압 치료제 중 베타차단제나 이뇨제를 복용중인 자 3) 고지혈증으로 진단받아 약물을 복용 중인 자 4) 갑상선 기능 저하증, 쿠싱 증후군 등의 내분비질환으로 인한 비만 대상자 5) 우울증, 식사장애, 정신분열증, 알코올중독증, 약물중독 등의 신경 또는 정신학적으로 중요한 병력이 있거나 질환을 앓고 있는 환자 6) 담낭질환, 위장관계 질환(위궤양, 십이지장궤양 등) 및 설사(역상 또는 역상에 가까운 대변을 부정시에 배출하는 것) 등의 대사질환, 동풍, 포르피

	<p>리아가 현재 진행중인 환자</p> <p>7) 혈청 내 간수치(ALT, AST, r-GT)가 정상의 상한선보다 2.5배 이상인 경우</p> <p>8) 혈청 creatinine 수치가 2.0mg/dl 이상인 경우</p> <p>9) 스크리닝 이전 3개월 이내에 비만치료제(흡수저해제 및 식욕억제제) 및 항우울제, 피임약, 경구용 스테로이드제제, 암페타민, 페노다디아진, 싸이프로헵타딘, 여성호르몬제 등의 체중에 영향을 줄 수 있는 약제를 복용한 경우</p> <p>10) 스크리닝 이전 3개월 이내에 5% 이상의 의도적인 체중감소가 있었던 자</p> <p>11) 스크리닝 이전 6개월 이내에 체중감량을 위해 위성형, 장관절제 등의 수술이나 기타 외과적 수술의 경험이 있는 대상자</p> <p>12) 스크리닝 이전 6개월 이내에 심질환(심부전, 협심증, 심근경색, 관상동맥 우회로술, 혈관확장술)이 있는 환자</p> <p>13) 스크리닝 이전 5년 이내 악성 종양 진단 및 치료를 받은 적이 있는 환자</p> <p>14) 임부 또는 수유부이거나 시험기간 중 효과적인 피임방법을 사용할 것을 동의하지 않은 가임기 여성(단, 경구용 피임제의 복용은 불가)</p> <p>15) 최근 3개월 이내에 다른 임상시험에 참여한 경험이 있는 환자</p> <p>16) 심한 근골격계 질환으로 운동을 할 수 없을 것으로 판단되는 경우</p> <p>17) 담당자의 소견으로 볼 때, 인체적용시험 참여에 부적합하다고 판단한 자</p>
시험식품명	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 시험용량 1군: MJB-01 1.25g/일 ▪ 시험용량 2군: MJB-01 2.5g/일
대조식품명	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 대조군: MJB-01 0g/일
투여방법 및 투여기간	<p>인체적용시험용식품을 아침, 저녁 총 2회 식전 30분에 3캡슐씩 하루 총 6캡슐을 12주간 경구 투여하게 하였다.</p>
시험기간	<p>각 대상자 별로 총 14주(스크리닝 2주, 약제투여기간 12주)가 소요 되었으며, 목표 대상자 36명의 전체 시험기간은 2014년 4월 7일 ~ 2014년 7월 9일로 약 15주간 진행하였다.</p>
평가방법	<p><u>기능성 (efficacy)</u></p> <p>① 1차 기능성 평가 (Primary endpoint):</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 체중감소율 <p>② 2차 기능성 평가 (Secondary endpoint):</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ DEXA를 통한 체지방(Fat%) 감소치 ▪ 체중 감소치 ▪ 체질량지수(BMI) 감소율 ▪ 체질량지수(BMI) 감소치 ▪ 허리/엉덩이 둘레(W/H ratio) 감소치 ▪ 허리 둘레 감소치 ▪ 엉덩이 둘레 감소치

	<ul style="list-style-type: none">• 혈청지질(Total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, Triglyceride) 감소지• 혈청지질(Total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, Triglyceride) 감소율 <p><u>안전성 (safety)</u></p> <ul style="list-style-type: none">• 인체적용시험용식품 복용 전과 복용 중, 복용 12주 후에 실험실 검사 및 활력 징후 측정을 실시하고 연구기간 내내 이상반응을 평가하였다.
결 과	<p>MJB 2.5그람, 1.25그람 및 대조약물을 BMI 25이상 29.9이하의 성인에게 12주간 투여한 결과, 통계적 유의성은 적었으나 대조군에 비해 체지방 및 체중을 감소시켰고 용량이 높을수록 체지방 감소가 효과적으로 나타났다. 복용 12주 후 체중 변화는 통계학적 유효성은 경계선상에 있으나 경단구슬모자반주정추출물 용량이 높은 군, 즉 1일당 경단구슬모자반주정추출물 2.5g을 복용한 군에서 체중 변화가 더 크게 나타났다.</p> <p>안전성에서 12주 복용기간 동안 시험식품과 관련된 이상반응은 소화불량 등이었고 중대하거나 치료를 요하는 이상반응이 나타나지 않았으므로 안전성을 확인할 수 있으며, 활력징후 및 혈액학적 검사에서 이상소견이 나타나지 않았으므로 안전하게 사용할 수 있을 것으로 판단된다.</p>

제 2 절. 곰솔을 이용한 체지방 감소 건강기능식품 개발

1. 곰솔 원료수급

가. 원료수급

- (1) 소나무과는 예로부터 부위별로 송엽, 송유, 송절, 송필두, 송향 등으로 불리움.
- (2) 송엽은 소나무과 소나무속(*Pinus L.*)을 뜻하는데 유송, 마미송, 설남송 등이 대표적이거나 이들은 우리나라에 자라지 않는 종으로 소나무, 곰솔, 잣나무 등이 우리나라에 자라고 이 효과는 달이거나 술에 담궈 먹거나, 물로 씻는데 감기예방, 유행성 뇌막염 예방, 만성기관지염 치료 등에 사용됨.
- (3) 송필두는 소나무의 어린가지의 끝부분으로서 혈액순환을 촉진하고 통증을 완화시키는 효능이 있는 것으로 알려짐. 송향은 유상의 나무진을 증류하여 얻어진 잔유물을 뜻하는 것으로 독을 제거하고 새살이 돋아나게 하며 통증을 완화시킴. 송유는 송진을 뜻하는 것으로 오랫동안 낫지 않는 옴의 치료에 쓰였고, 송절은 가지와 줄기의 마디를 뜻하는 것으로 따뜻한 기운이고, 독이 없는 것으로 알려져 있음. 제주도에 분포하는 소나무속 식물은 곰솔, 소나무 등으로 해발 600 m 이하의 지역에 곰솔이 대부분임.
- (4) 곰솔 생산량 및 생산시기
- (가) 제주도의 산림 면적 중 침엽수 면적은 23,9687ha로서 넓은 면적을 차지하며 있으며, 그 중 1/2정도가 곰솔이 차지하고 있어, 곰솔의 잎을 대량 채집하는 데는 아무런 문제가 없을 것으로 판단됨.
- (나) 곰솔의 채집은 사계절 가능하며, 특히 겨울철과 이른 봄에 채집하는 것이 가장 효과가 좋으며, 마을 공동체에서 생물량 1톤에 500,000원 정도 구입이 가능함. 또한 마을 공동체 수익 사업으로 전개하면 원료 수급에는 문제가 없음.

<표 3-48. 제주지역의 산림면적(단위: ha)>

	총계	침엽수	활엽수	흔효림	무림목지
계	89,094	23,967	29,952	11,023	24,152
제주시	45,383	13,350	15,410	4,679	11,944
서귀포시	43,711	10,617	14,542	6,344	12,208



곰솔

<그림 3-104. 곰솔 원료>

(5) 대량원료 확보를 위한 지역 선정 및 원료 확보

(가) 선정후보지역: 대정읍, 애월읍, 성산읍, 남원읍

(나) 대량원료 확보 최종 선정지역 : 지역별 추출수율이 가장 높은 남원읍을 선정함.



<그림 3-105. 곰솔 채집 현장>

(다) 곰솔 원료 대량 확보

- 채집지역 : 제주도 서귀포시 남원읍 신례리

- 채 집 일 : 2013년 1월 28일

- 채집부위 : 잎

- 채 집 량 : 417kg

(라) 곰솔 원료 대량 확보



곰솔 채집

원료 손질 작업

채집된 곰솔

<그림 3-106. 곰솔 원료 대량 확보 현장>

(마) 대량 확보된 곰솔 표본 확립



<그림 3-107. 곰솔 표본>

2. 곰솔의 최적 추출 조건 확립

가. 곰솔의 최적 추출공정 확립을 위한 용매농도별 추출수율에 따른 추출조건

- (1) 방법 : 곰솔 분말시료 10g 당 20배에 해당하는 주정 200ml 침출하여 추출함. 적정 추출수율 탐색을 위해 주정 농도는 0, 20, 40, 60, 80, 100% 에탄올 농도별 추출함.
- (2) 결과 : 60% 주정 농도로 추출하였을 때 추출수율이 가장 높았음.

<표 3-49. 곰솔 용매별 추출량과 추출수율>

용매농도(%)	추출량(g)	추출수율(%)
D.W	1.7±0.4	16.5
20	2.4±0.1	23.7
40	2.6±0.0	26.2
60	2.7±0.1	27.0
80	2.7±0.0	26.7
100	2.1±0.0	21.2

나. 추출온도별 추출수율 확인

- (1) 방법 : 곰솔 분말시료 10g 당 20배에 해당하는 60% 주정 200ml에 침출하여 추출함. 침출시 온도에 따른 추출수율을 알아보기 위해 실온, 40, 50, 60℃의 온도로 24시간 추출함.
- (2) 결과 : 추출수율은 60℃가 다른 온도에 비해 조금 높게 나타났으나 큰 차이는 보이지 않음.

<표 3-50. 곰솔 추출온도별 추출량과 추출수율>

온도(°C)	추출량(g)	추출수율(%)
실온	2.6±0.2	25.9
40	2.6±0.2	25.8
50	2.6±0.2	26.1
60	2.6±0.2	26.2

다. 지역별 추출수율 확인

(1) 방법 : 곰솔 분말시료 10g 당 20배에 해당하는 60% EtOH 200ml에 침출하여 추출함. 지역에 따른 추출수율을 알아보고 대량원료 수급지역을 선정하기 위해 제주도내 4개 지역에서 채집한 곰솔시료를 각각 침출하여 24시간 추출함.

(2) 결과 : 남원읍지역이 추출수율이 가장 높게 나타났고, 애월읍지역은 다른 3개 지역에 비해 추출수율이 떨어지는 것으로 나타남.

<표 3-51. 곰솔 지역별 수율>

지역명	추출량(g)	추출수율(%)
대정읍	2.9±0.1	29.4
애월읍	2.8±0.1	27.8
성산읍	2.9±0.1	29.2
남원읍	3.0±0.1	29.7

라. 추출용매 및 추출시간에 따른 추출수율 비교

(1) 방법 : 곰솔 분말시료 3g을 각각 70ml의 60% 에탄올과 60% 주정을 이용하여 추출 - 추출시간은 12시간, 24시간으로 하여 추출 수율을 확인

※ 추출수율 산정 및 실험법은 대한약전 9개정 묶은 에탄올 엑스정량법을 따름



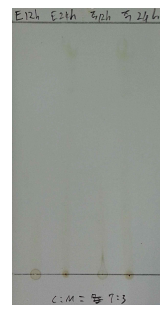
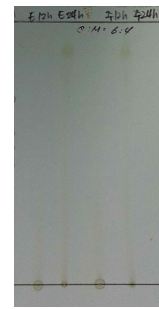
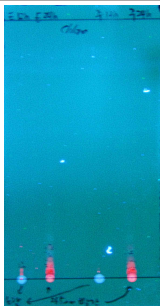
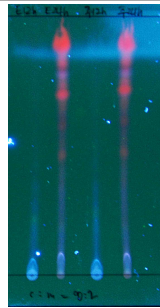
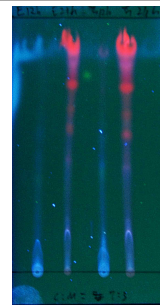
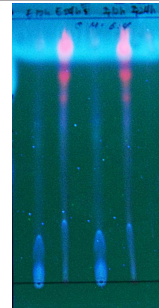

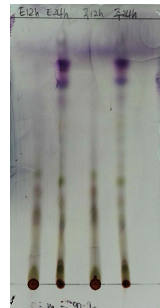
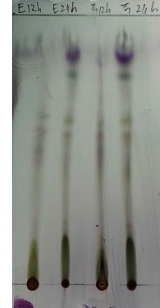
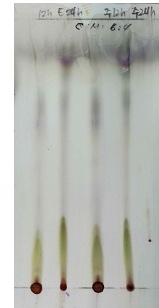
(2) 결과 : 60% 에탄올 추출물과 주정 추출물간의 수율 차이는 에탄올 추출물에 비해 주정 추출물이 12시가 침출시간일 때는 0.2%, 24시간 침출시간일 때는 2.3 % 높게 나타났음.

(가) 추출용매 및 침출시간에 따른 수율 차이

<표 3-52. 곰솔 추출용매 및 침출시간에 따른 수율>

용매	침출시간(hr)	추출량(g)	추출수율(%)	수율차이(%)
60% EtOH	12	0.559	18.6	
	24	0.625	20.8	
60% 주정	12	0.565	18.8	+ 0.2
	24	0.693	23.1	+ 2.3

(나) Normal phase TLC chromatography

	CM=10:0	CM=8:2	CM=7:3	CM=6:4	비교
발색 전					
UV 365nm					Rf별 특이적 성분 차이 없음 (C: chloroform, M: methanol, 발색= anis-aldehyde)
발색 반응					
시료 순서	60% EtOH, 12hr	60% EtOH, 24hr	60% 주정, 12hr	60% 주정, 24hr	

3. 곰솔의 GMP-Pilot Scale 추출 공정 확립

가. 생물원료 대량 확보 및 시료 전처리

(1) 방법

(가) 2013년 1월 곰솔 생물원료 800kg 확보

(나) 잎과 가지를 분리하여 곰솔 잎 417kg 확보

(다) 40℃ 열풍건조기에서 3일간 건조 후 대용량분쇄기를 이용하여 분쇄

(라) 곰솔 분말시료 245kg 확보



① 생물원료 확보



② 원료손질(잎과 가지 분리)



④ 생물원료 건조



⑤ 분쇄



⑥ 분말시료 확보

<그림 3-108. 곰솔 대량 확보를 위한 시료 전처리>

나. GMP-Pilot Scale 추출과정

(1) 방법 : 분말시료와 용매를 혼합하여 적정온도와 시간동안 추출함. 원심분리하여 분말시료와 용매를 분리하고 마이크로필터로 여과함. 여과된 추출액을 감압농축한 후 농축액을 냉동함. 냉동된 농축액을 동결건조하여 대용량 추출물을 확보함.

다. 곰솔 추출물 대량제작

(1) 방법

- 곰솔 분말시료 210kg을 70kg씩 3회에 걸쳐 추출
- 95% 주정 882L와 정수 518L를 추출기에 넣어 혼합하여 60% 주정 제조
- 곰솔 분말시료 70kg을 추출기에 투입하여 50℃에서 24시간 침출
- 추출액을 원심분리 후 10 μ m 필터로 여과 후 농축
- 농축액을 동결건조 후 추출물 60kg 확보

4. 영양성분 분석

가. 영양성분 검사와 잔류농약 검사가 가능한 공인기관 의뢰
(제주대학교 생명과학기술혁신센터)

나. 시험 결과

- 영양분석은 3번 반복 실험 결과 아래와 같음.

<표 3-53. 곰솔 영양분석 자료>

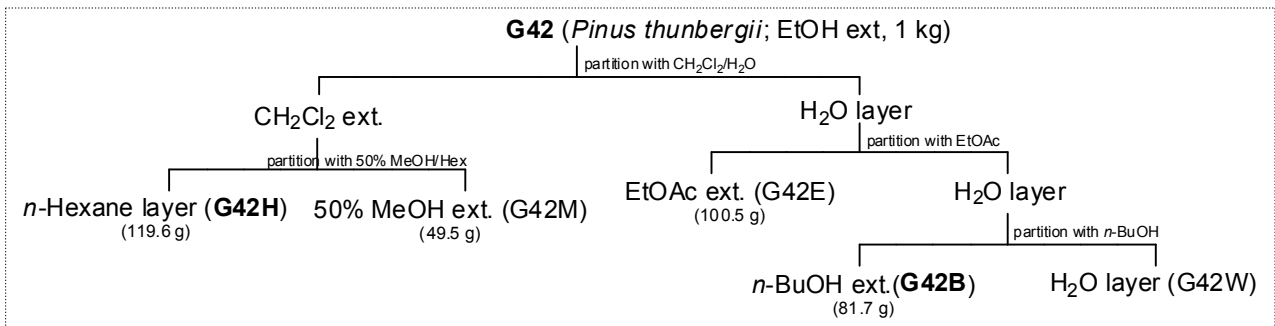
분석항목	곰솔
열량	397.8 ± 5.2
탄수화물	83.7 ± 0.9
수분	3.5 ± 0.2
회분	4.3 ± 0.2
단백질	2.6 ± 0.2
지방	5.9 ± 1.1
식이섬유	21.2 ± 3.6
납	0.2 ± 0.2
카드뮴	0.1 ± 0.1
총수은	불검출
총비소	1.2 ± 0.7
나트륨	1266.5 ± 173.5
대장균	음성

5. 곰솔의 지표성분 및 유효성분 분석

가. 곰솔로부터 기능성 유효물질 분리정제 및 구조규명

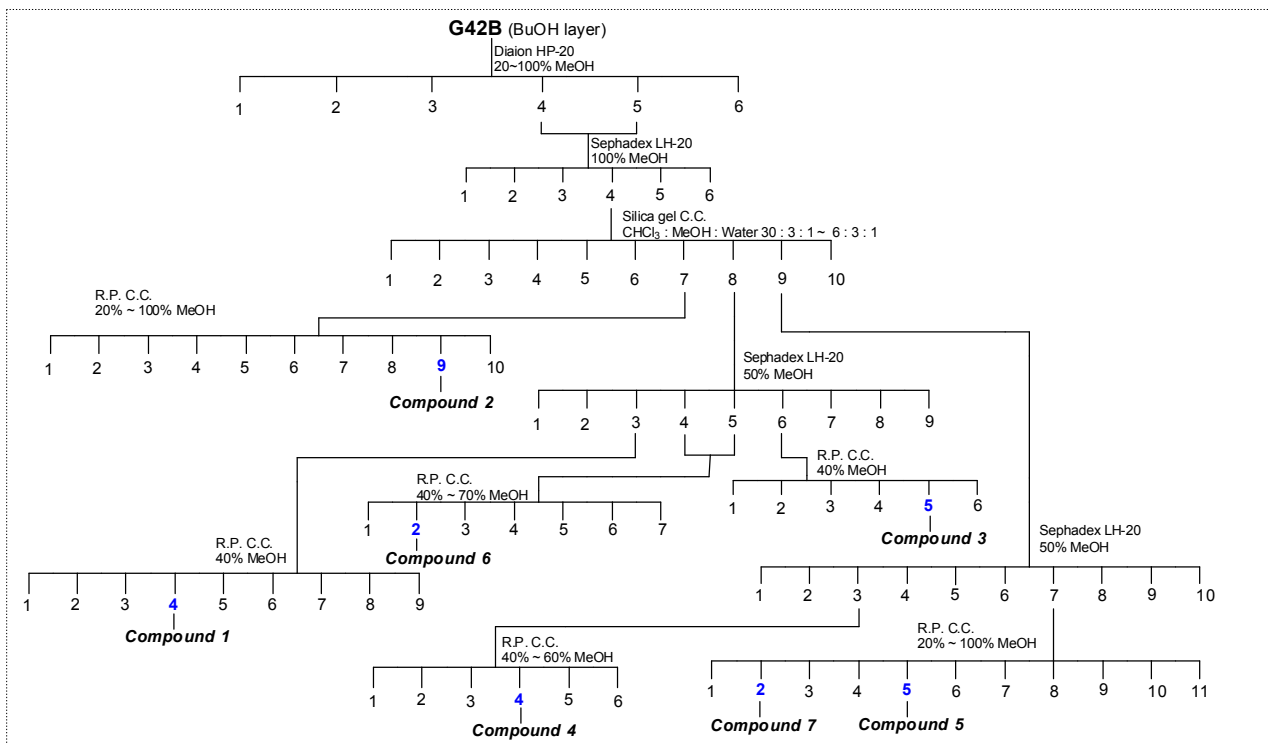
(1) 건조 곰솔잎 (pine needles)의 H₂O, 20%, 40%, 60%, 80%, 95% 에탄올 추출물에 대하여 Oil Red O assay를 통해 유의성 있는 활성이 확인되어진 80% 에탄올 곰솔잎 추출물을 선정하여 활성물질을 분리하고 정제하기 위한 연구를 수행함.

(2) 분획 방법 : 곰솔잎 (code name : G42)의 건조물 5 Kg을 에탄올로 2회 반복 추출하였으며, 추출액을 여과한 후 여액을 회전 감압 농축기로 농축하여 에탄올 추출물 (1 Kg)을 얻어냄. 에탄올 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 CH₂Cl₂, EtOAc (G42E), BuOH (G42B)로 용매 분획하였으며, CH₂Cl₂ 분획물에 대하여 *n*-Hexane으로 현탁하여 50% MeOH (G42M)과 *n*-Hexane (G42H)으로 각각 극성별로 용매 분획물을 얻음. 이들 분획 중 활성이 확인된 BuOH 추출물에 대하여 activity guided fractionation방법을 이용하여 column chromatography 기법으로 분리함 (도식 3-12~14).



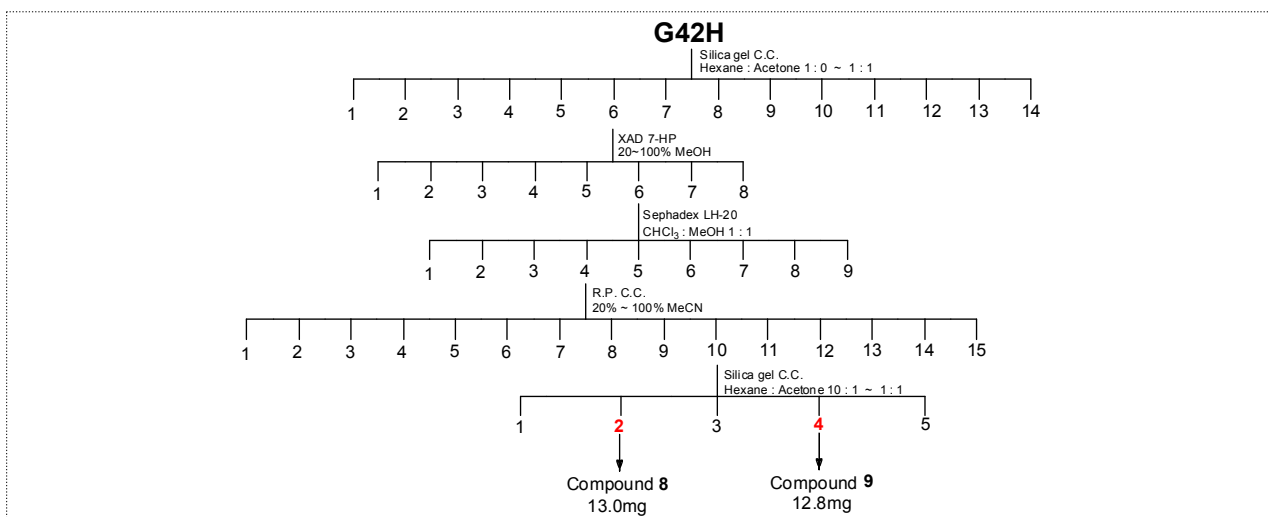
<도식 3-12. 곰솔잎 (G42) 추출물의 분획>

(3) 곰솔의 80% 에탄올 추출물로 활성물질 및 지표성분을 찾기 위해 추출물을 분획하고, column chromatography (CC)를 통해 활성물질로서의 순수물질을 분리하고 정제함. BuOH 분획물 (G42B) 81.7g에 대하여 충전제 Diaion HP-20을 이용하여 H₂O, 20%, 40%, 60%, 80%, 100%의 이동상에 따라 6개의 fraction (G42B-1~6)을 얻어냄. 이중 G42B-4, G42B-5 분획물에 대하여 Sephadex LH-20 (이동상 MeOH)를 통하여 6개의 소분획 (G42B-45-1~6)을 얻어냄. 이중 G42B-45-4 fraction에 대하여 silica gel (70-230 mesh) CC (이동상 CH₂Cl₂-MeOH-Water=30:3:1~6:3:1)을 통하여 10개의 fraction (G42B-45-4-1~10)을 얻어냄. 이중 G42B-45-4-7 분획물에 대하여 reverse phase C18 CC (이동상 20% ~ 100% MeOH)을 통하여 화합물 2를 분리정제함. G42B-45-4-8 분획물에 대하여 reverse phase C18 CC을 통하여 화합물 1, 3, 4, 6을 분리정제 함. G42B-45-4-9 분획물에 대하여 Sephadex LH-20 및 reverse phase C18 CC을 통하여 화합물 5와 7을 분리정제 함. 활성물질 및 지표성분의 분리 정제의 과정은 아래와 같음 (도식 3-13).



<도식 3-13. Isolation of compounds 1-7 from the pine needles of *P. thunbergii*>

(4) 곰솔의 80% 에탄올 추출물로 활성물질 및 지표성분을 찾기 위해 추출물을 분획하고, column chromatography (CC)를 통해 활성물질로서의 순수물질을 분리하고 정제함. Hexane 분획물 (G42H) 119.6g에 대하여 충전제 silica gel (70-230 mesh) CC (이동상 Hexane-Acetone=1:0~1:1)을 통하여 14개의 fraction (G42H-1~14)을 얻어냄. 이 중 G42H-6 fraction에 대하여 Sephadex LH-20, reverse phase C18 CC 및 silica gel (70-230 mesh) CC를 통하여 화합물 8과 9를 분리정제 함. 활성물질 및 지표성분의 분리 정제의 과정은 아래와 같음 (도식 3-14).



<도식 3-14. Isolation of compounds 8 and 9 from the pine needles of *P. thunbergii*>

나. 분광학적 분석 data를 통한 분리정제 단일화합물의 구조 규명

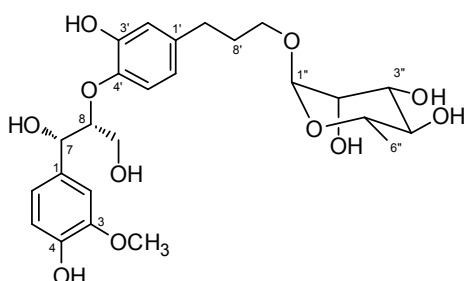
(1) NMR data (^1H -, ^{13}C -NMR, ^1H - ^1H COSY, HSQC, HMBC)를 통한 proton과 carbon의 connectivity에 대한 정보 및 mass data를 이용한 molecular formula의 확인하고 결정된 구조에 대한 data를 기존 문헌과 비교 확인

(2) 구조규명 결과

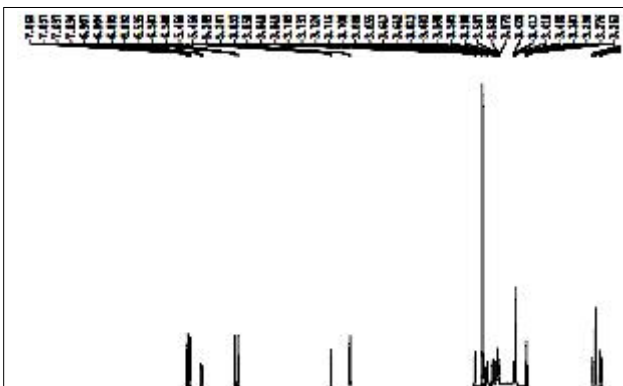
(가) 지표물질 및 유효물질 구조 규명 NMR 결과

① Identification of compound 1 (pinusthunbergiside A)

- White powder; $[\alpha]_D^{24}$ -31.5 (c 0.02, CH_3OH); ^1H -NMR (700 MHz, CD_3OD) δ 7.03 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-2), 6.94 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5'), 6.87 (1H, dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, H-6), 6.78 (1H, s, H-2'), 6.70 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-5), 6.58 (1H, dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, H-6'), 4.92 (1H, overlap, H-7), 4.66 (1H, s, H-1''), 4.10 (1H, m, H-8), 3.84 (3H, s, 3'- OCH_3), 3.84 (1H, br s, H-2''), 3.75 (1H, dd, $J = 11.5, 3.5$ Hz, H-9a), 3.68 (1H, overlap, H-9'a), 3.68 (1H, m, H-3''), 3.60 (1H, m, H-5''), 3.49 (1H, dd, $J = 11.5, 5.6$ Hz, H-9b), 3.39 (1H, overlap, H-9'b), 3.39 (1H, overlap, H-4''), 2.60 (2H, m, H-7'), 1.86 (2H, m, H-8'), 1.26 (3H, d, $J = 5.6$ Hz, H-6''); ^{13}C -NMR spectral data are shown in Table 1; ESIMS (positive) m/z 533 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; ESIMS (negative) m/z 509 $[\text{M}-\text{H}]^-$.



<그림 3-109. Compound 1의 구조>



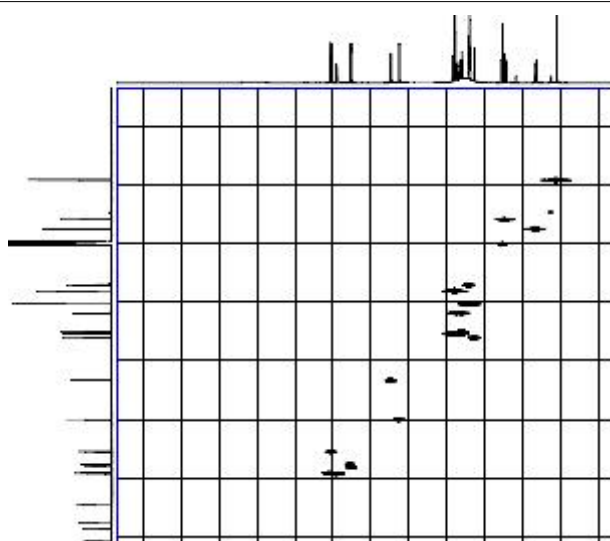
<그림 3-110.

^1H -NMR spectrum of compound 1



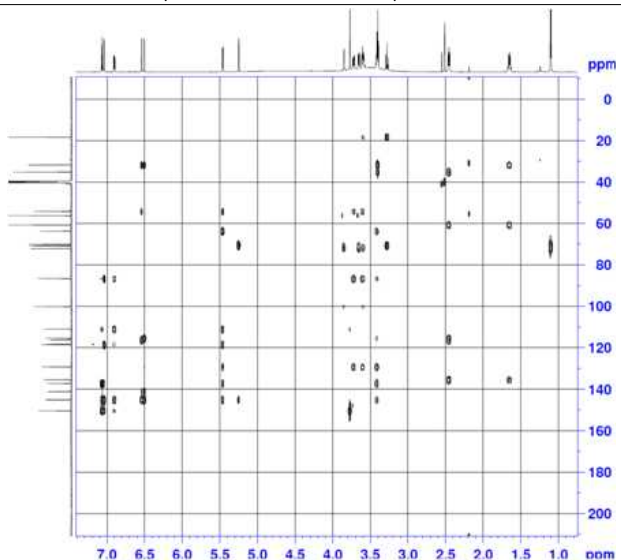
<그림 3-111.

^{13}C -NMR spectrum of compound 1



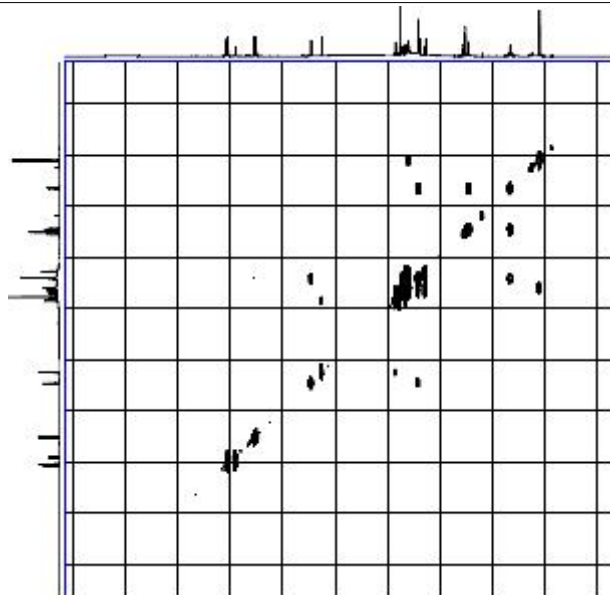
<그림 3-112.

HSQC spectrum of compound 1



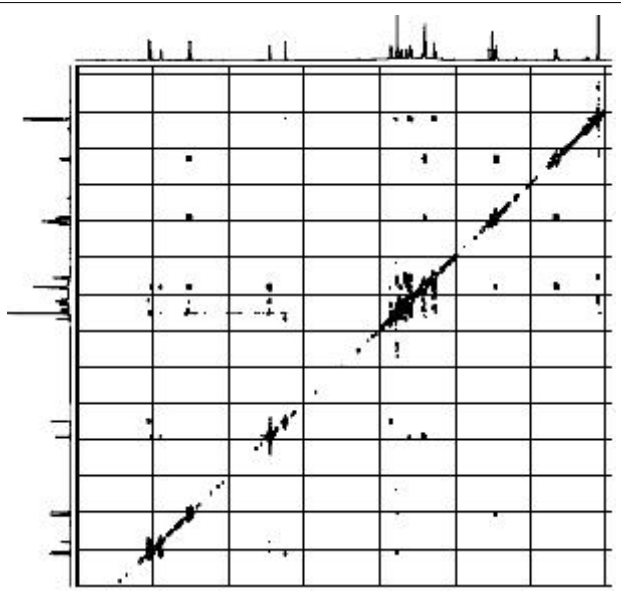
<그림 3-113.

HMBC spectrum of compound 1



<그림 3-114.

COSY spectrum of compound 1

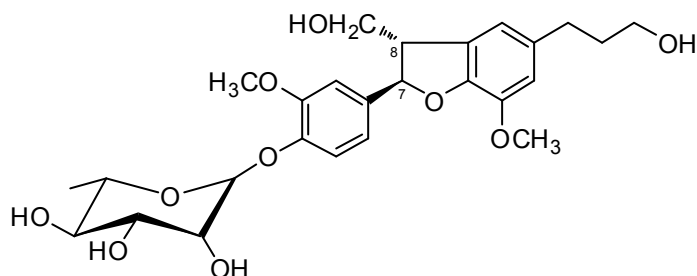


<그림 3-115.

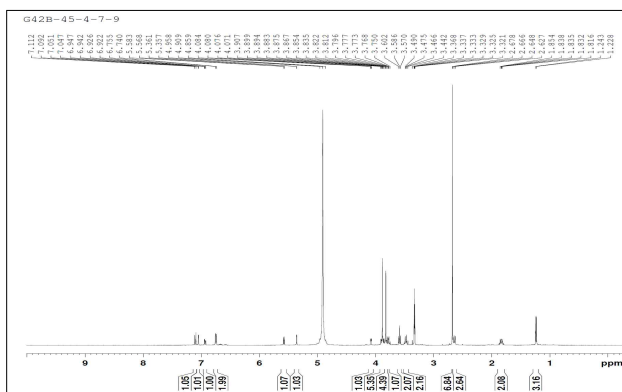
ROESY spectrum of compound 1

② Identification of compound 2 (icariside E4)¹⁾

- White powder; $[\alpha]_D^{25} - 57.0$ (c 0.02, CH₃OH); ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 7.10 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 7.05 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2), 6.93 (1H, dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, H-6), 6.75 (1H, br s, H-2'), 6.74 (1H, br s, H-6'), 5.58 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-7), 5.36 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-1''), 4.08 (1H, dd, $J = 3.4, 1.6$ Hz, H-2''), 3.89 (1H, m, H-3''), 3.88 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.87 (1H, m, H-5''), 3.82 (3H, s, 3-OCH₃), 3.81 (1H, overlap, H-9a), 3.77 (1H, m, H-9b), 3.59 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, H-9'), 3.48 (1H, br q, $J = 6.0$ Hz, H-8), 3.47 (1H, dd, $J = 9.6, 9.6$ Hz, H-4), 2.65 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-7'), 1.81 (2H, m, H-8'), 1.24 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6''); ¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) spectral data are shown in Table 1; ESIMS (positive) m/z 529 [M+Na]⁺, 1035 [2M+Na]⁺; ESIMS (negative) m/z 551 [M+COOH]⁻, 1057 [2M+COOH]⁻.

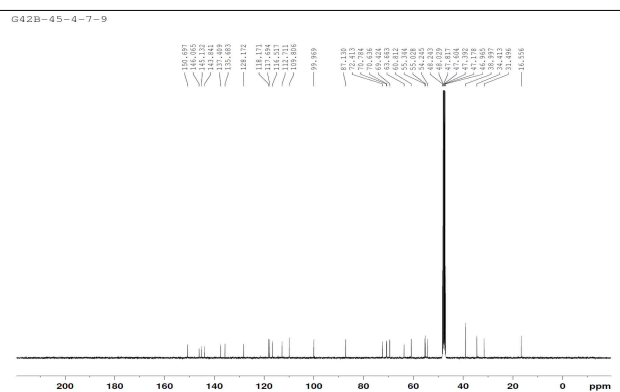


<그림 3-116. Compound 2의 구조>



<그림 3-117.

¹H-NMR spectrum of compound 2>

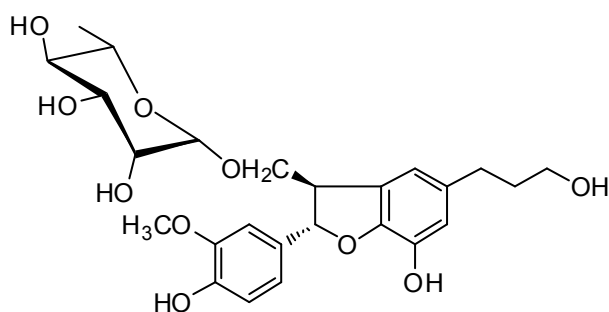


<그림 3-118.

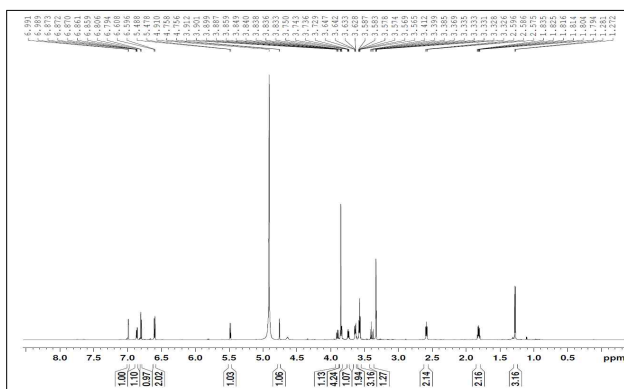
¹³C-NMR spectrum of compound 2>

③ Identification of compound 3 (massonioside A)²⁾

- White powder; $[\alpha]_D^{25} +13.3$ (c 0.02, CH₃OH); ¹H-NMR (CD₃OD, 700 MHz) δ 6.99 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-2), 6.87 (1H, dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, H-6), 6.80 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, H-5), 6.61 (1H, br s, H-2'), 6.60 (1H, br s, H-6'), 5.48 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-7), 4.76 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-1''), 3.90 (1H, dd, $J = 9.4, 7.7$ Hz, H-9a), 3.85 (3H, s, 3-OCH₃), 3.84 (1H, dd, $J = 3.2, 1.4$ Hz, H-2''), 3.74 (1H, dd, $J = 9.8, 4.9$ Hz, H-9b), 3.64 (1H, dd, $J = 9.8, 3.5$ Hz, H-3''), 3.63 (1H, overlap, H-8), 3.58 (1H, t, $J = 6.3$ Hz, H-5''), 3.57 (2H, overlap, H-9'), 3.40 (1H, m, H-4''), 2.59 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-7'), 1.81 (2H, m, H-8'), 1.28 (3H, d, $J = 6.3$ Hz, H-6''); ¹³C-NMR (CD₃OD, 175 MHz) spectral data are shown in Table 1; ESIMS (positive) m/z 515 [M+Na]⁺, 1007 [2M+Na]⁺; ESIMS (negative) m/z 491 [M-H]⁻, 983 [2M-H]⁻.

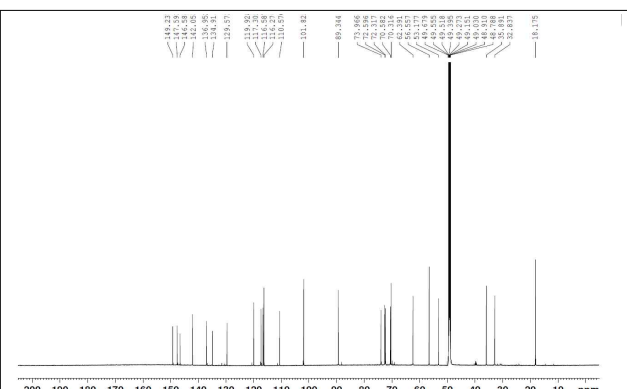


<그림 3-119. Compound 3의 구조>



<그림 3-120.

¹H-NMR spectrum of compound 3>

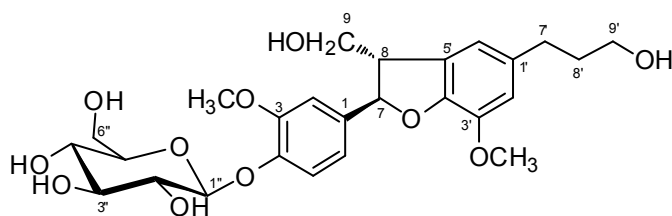


<그림 3-121.

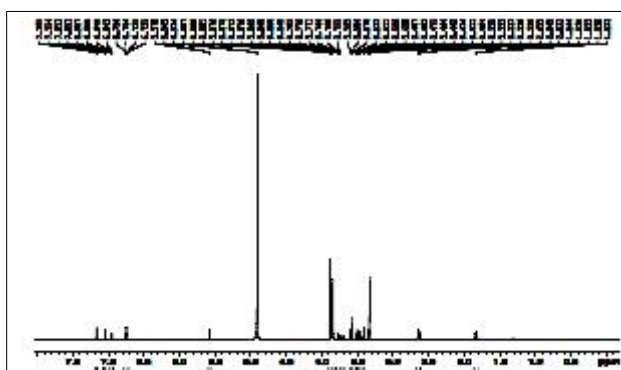
¹³C-NMR spectrum of compound 3>

④ Identification of compound 4 (dihydrodehydrodiconiferyl alcohol-4-O-β-D-glucopyranoside)³⁾

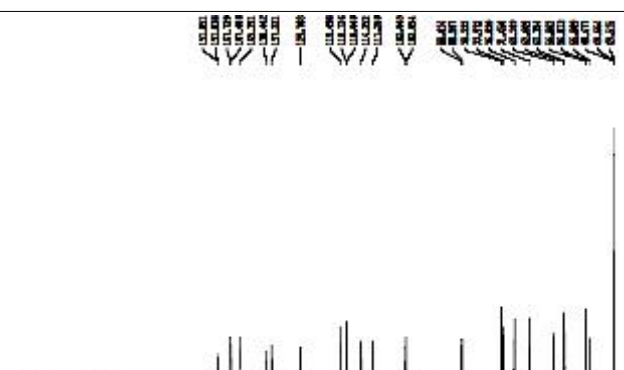
- White powder; $[\alpha]_D^{24} +7.2$ (c 0.02, CH₃OH); ¹H-NMR (CD₃OD, 700 MHz) δ 7.16 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-5), 7.05 (1H, d, $J = 1.4$ Hz, H-2), 6.95 (1H, dd, $J = 8.4, 1.4$ Hz, H-6), 6.76 (1H, s, H-2'), 6.74 (1H, s, H-6'), 5.57 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, H-7), 4.91 (1H, overlap, H-1''), 3.89 (1H, overlap, H-6''), 3.88 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.87 (1H, overlap, H-9a), 3.85 (3H, s, 3-OCH₃), 3.76 (1H, dd, $J = 7.7, 3.5$ Hz, H-9b), 3.70 (1H, brd, $J = 12.3$ Hz, H-6''), 3.59 (1H, t, $J = 6.3$ Hz, H-9'), 3.51 (1H, m, H-2''), 3.47 (1H, overlap, H-8), 3.46 (1H, overlap, H-3''), 3.41 (1H, overlap, H-4''), 3.40 (1H, overlap, H-5''), 2.64 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-7'), 1.83 (2H, m, H-8'); ¹³C-NMR (CD₃OD, 175 MHz) spectral data are shown in Table 1; ESIMS (positive) m/z 545 [M+Na]⁺, 1067 [2M+Na]⁺; ESIMS (negative) m/z 521 [M-H]⁻, 1043 [2M-H]⁻, 567 [M+COOH]⁻, 1089 [2M+COOH]⁻.



<그림 3-122. Compound 4의 구조>



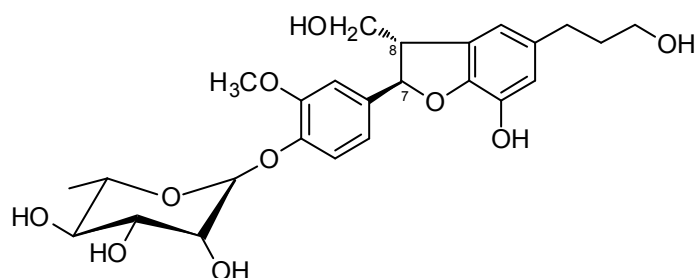
<그림 3-123. ¹H-NMR spectrum of compound 4>



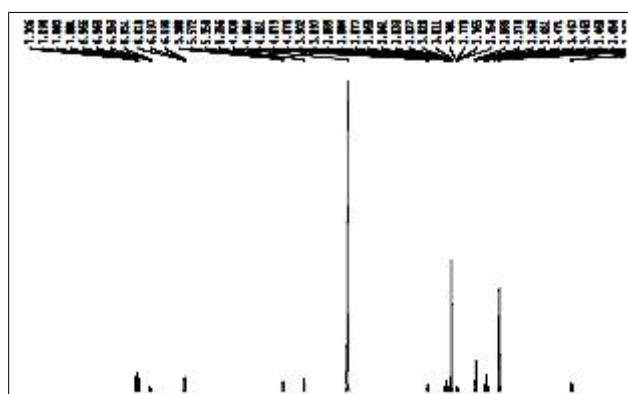
<그림 3-124. ¹³C-NMR spectrum of compound 4>

⑤ Identification of compound 5 (isomassonanoside B)⁴⁾

- White powder; $[\alpha]_D^{24}$ -42.3 (c 0.02, CH₃OH); ¹H-NMR (CD₃OD, 700 MHz) δ 7.10 (1H, d, J = 8.4 Hz, H-5), 7.08 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-2), 6.96 (1H, dd, J = 8.8, 2.1 Hz, H-6), 6.62 (1H, s, H-6'), 6.60 (1H, s, H-2'), 5.58 (1H, d, J = 5.6 Hz, H-7), 5.36 (1H, d, J = 1.4 Hz, H-1''), 4.08 (1H, dd, J = 3.5, 2.1 Hz, H-2''), 3.89 (1H, dd, J = 9.1, 3.5 Hz, H-3''), 3.87 (1H, dd, J = 10.6, 5.6 Hz, H-9a), 3.83 (1H, overlap, H-5''), 3.82 (3H, s, 3-OCH₃), 3.77 (1H, dd, J = 11.2, 7.7 Hz, H-9b), 3.58 (2H, t, J = 6.3 Hz, H-9'), 3.47 (2H, t, J = 9.8 Hz, H-4''), 3.46 (1H, overlap, H-8), 2.58 (2H, t, J = 7.0 Hz, H-7'), 1.81 (2H, m, H-8'), 1.24 (3H, d, J = 6.3 Hz, H-6''); ¹³C-NMR (CD₃OD, 175 MHz) spectral data are shown in Table 1; ESIMS (positive) m/z 515 [M+Na]⁺, 1007 [2M+Na]⁺; ESIMS (negative) m/z 491 [M-H]⁻, 983 [2M-H]⁻, 537 [M+COOH]⁻.

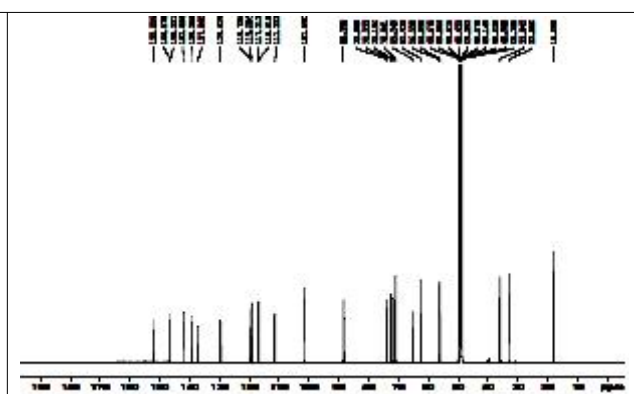


<그림 3-125. Compound 5의 구조>



<그림 3-126.

¹H-NMR spectrum of compound 5>

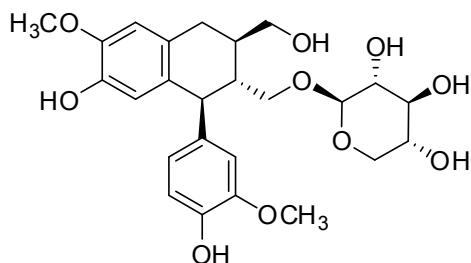


<그림 3-127.

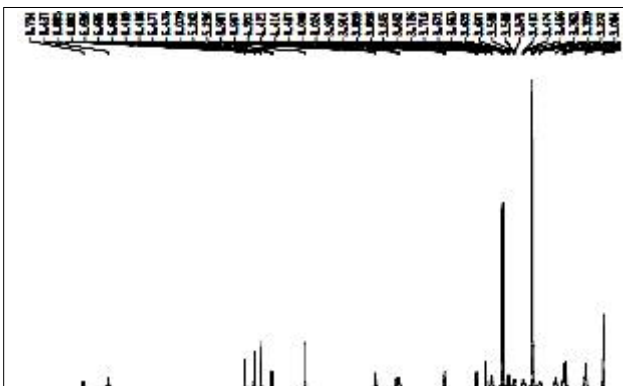
¹H-NMR spectrum of compound 5>

⑥ Identification of compound 6 (schisandriside)⁵⁾

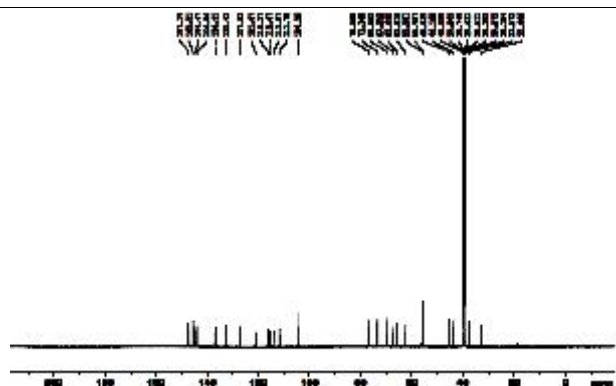
- White powder; $[\alpha]_D^{25} +42.2$ (c 0.02, CH₃OH); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 700 MHz) δ 6.80 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-2), 6.69 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-5), 6.60 (1H, s, H-2'), 6.48 (1H, dd, $J = 8.0, 2.0$ Hz, H-6), 6.07 (1H, s, H-5'), 4.03 (1H, d, $J = 10.4$ Hz, H-7), 3.91 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-1''), 3.85 (1H, d, $J = 7.6$ Hz, H-9a), 3.72 (3H, s, 3-OCH₃), 3.71 (3H, s, 3'-OCH₃), 3.65 (1H, dd, $J = 11.4, 5.6$ Hz, H-5''), 3.58 (1H, m, H-9'a), 3.47 (1H, m, H-9'b), 3.27 (1H, m, H-4''), 3.08 (1H, m, H-3''), 2.99 (1H, overlap, H-2''), 2.98 (1H, overlap, H-5''), 2.98 (1H, overlap, H-9b), 2.72 (2H, d, $J = 7.2$ Hz, H-7'), 1.89 (1H, m, H-8'), 1.70 (1H, t, $J = 10.4$ Hz, H-8); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 175 MHz) spectral data are shown in Table 1; ESIMS (positive) m/z 515 [M+Na]⁺, 1007 [2M+Na]⁺; ESIMS (negative) m/z 491 [M-H]⁻, 983 [2M-H]⁻.



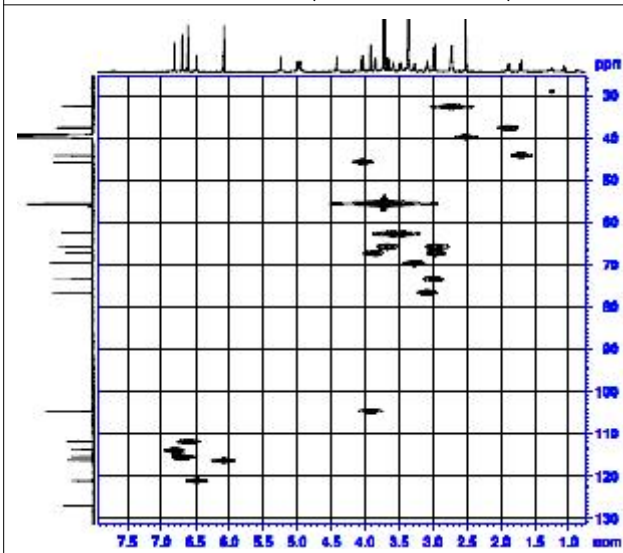
<그림 3-128. Compound 6의 구조>



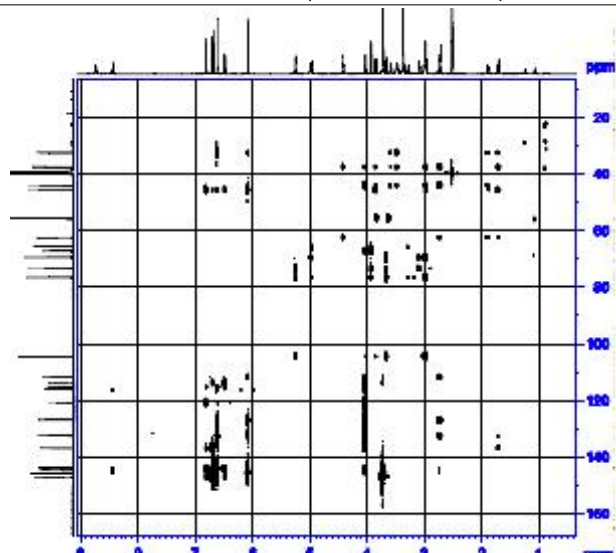
<그림 3-129. ^1H -NMR spectrum of compound 6>



<그림 3-130. ^{13}C -NMR spectrum of compound 6>



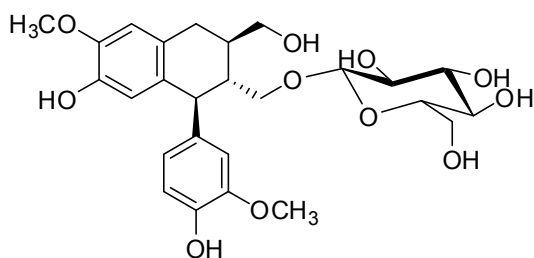
<그림 3-131. HSQC spectrum of compound 6>



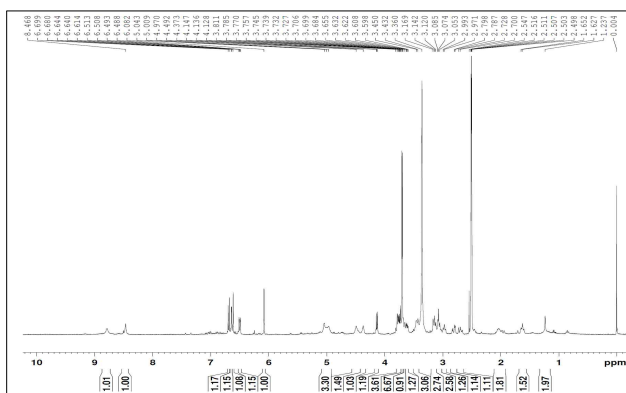
<그림 3-132. HMBC spectrum of compound 6>

⑦ Identification of compound 7 (isolariciresinol-9-*O*-β-D-glucopyranoside)⁶⁾

- White powder; $[\alpha]_D^{25} +42.2$ (c 0.02, CH₃OH); ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz) δ 6.69 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-5), 6.64 (1H, d, *J* = 1.6 Hz, H-2), 6.61 (1H, s, H-2'), 6.50 (1H, dd, *J* = 8.0, 2.0 Hz, H-6), 6.08 (1H, s, H-5'), 4.14 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, H-1''), 3.71 (3H, s, 3-OCH₃), 3.70 (3H, s, 3'-OCH₃), 2.81 dd (1H, dd, *J* = 15.6, 4.4 Hz, H-7'a), 2.69 (1H, m, H-7'b), 2.03 (1H, m, H-8), 1.63 (1H, t, *J* = 10.4 Hz, H-8'); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz) spectral data are shown in Table 1; ESIMS (positive) *m/z* 545 [M+Na]⁺; ESIMS (negative) *m/z* 521 [M-H]⁻.

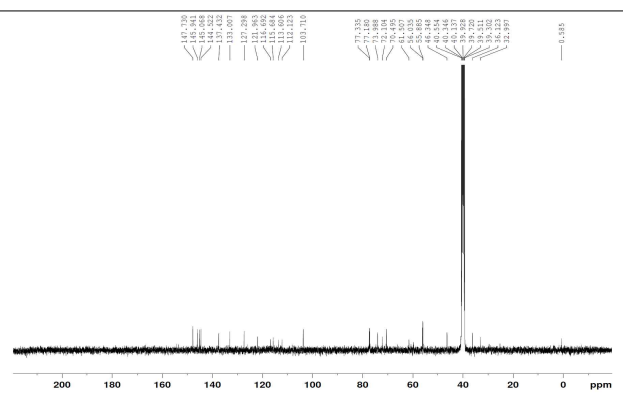


<그림 3-133. Compound 7의 구조>



<그림 3-134.

¹H-NMR spectrum of compound 7>



<그림 3-135.

¹³C-NMR spectrum of compound 7>

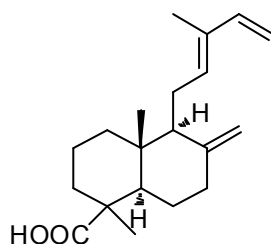
<表 3-54. ^{13}C -NMR Data of Compounds 2-7 (175 MHz, δ in ppm)>

Carbon	1 ^a	2 ^b	3 ^b	4 ^b	5 ^b	6 ^a	7 ^a
1	132.6	139.0	137.0	138.5	139.3	136.9	137.4
2	110.0	111.4	110.6	111.3	111.3	113.9	113.6
3	145.5	152.2	149.2	151.1	152.2	147.2	147.7
4	145.9	147.6	146.6	147.7	146.6	144.5	145.1
5	114.5	119.7	117.3	118.1	119.7	115.5	115.7
6	119.3	119.2	119.9	119.5	119.2	121.1	122.0
7	72.8	88.7	89.3	88.6	88.4	45.6	46.3
8	86.4	55.8	53.2	55.8	56.1	44.1	46.3
9	60.3	65.2	70.3	65.2	65.3	67.3	70.7
OCH ₃	54.9	56.9		56.8	56.6	55.6	56.0
1'	136.9	137.2	134.9	137.2	129.2	127.0	127.3
2'	115.9	114.3	116.3	114.3	116.8	111.8	112.1
3'	148.0	145.4	142.1	145.4	142.1	145.5	145.9
4'	144.7	146.7	147.6	147.6	146.6	144.1	144.5
5'	118.1	129.7	129.6	129.7	137.0	116.3	116.7
6'	119.2	118.2	116.6	118.1	117.2	132.6	133.0
7'	31.4	33.0	32.8	33.0	32.9	32.6	33.0
8'	31.0	36.0	35.9	36.0	35.9	37.6	36.1
9'	66.3	62.4	62.4	62.4	62.4	62.6	
OCH ₃		56.6	56.4	56.9		55.5	55.9
1''	100.3	101.5	101.8	102.9	101.5	104.6	103.7
2''	71.0	72.2	72.3	75.0	74.0	73.4	74.0
3''	71.1	72.3	72.6	78.0	72.3	76.6	77.2
4''	72.6	74.0	74.0	71.5	72.2	69.6	72.1
5''	68.4	71.0	70.6	78.3	71.0	65.7	77.3
6''	16.6	18.1	18.2	62.6	18.1		61.5

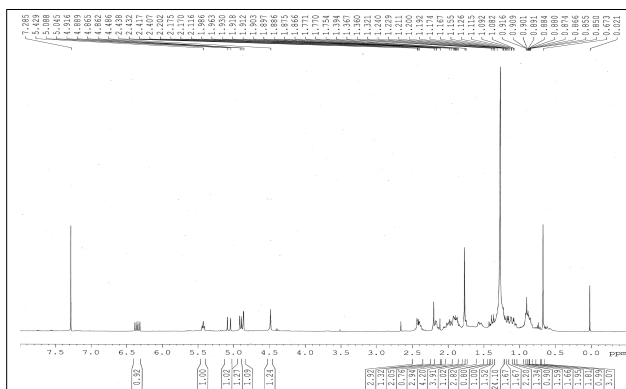
^a Measured at DMSO-*d*₆. ^b Measured at CD₃OD. The assignments were based on ¹H-¹H COSY, HSQC, and HMBC experiments.

⑧ Identification of compound 8 (*E*-communic acid)⁷⁾

- White powder; ¹H-NMR (CDCl₃, 700 MHz) δ 6.35 (1H, dd, *J* = 17.3, 10.8 Hz, H-14), 5.43 (1H, t, *J* = 6.4 Hz, H-12), 5.07 (1H, d, *J* = 17.6 Hz, H-15a), 4.90 (1H, d, *J* = 10.8 Hz, H-15b), 4.86 (1H, s, H-17a), 4.49 (1H, s, H-17b), 1.77 (3H, s, H-16), 1.27 (3H, s, H-18), 0.67 (3H, s, H-20); ¹³C-NMR (CDCl₃, 175 MHz) spectral data are shown in Table 2; ESIMS (positive) *m/z* 303 [M+H]⁺; ESIMS (negative) *m/z* 301 [M-H]⁻

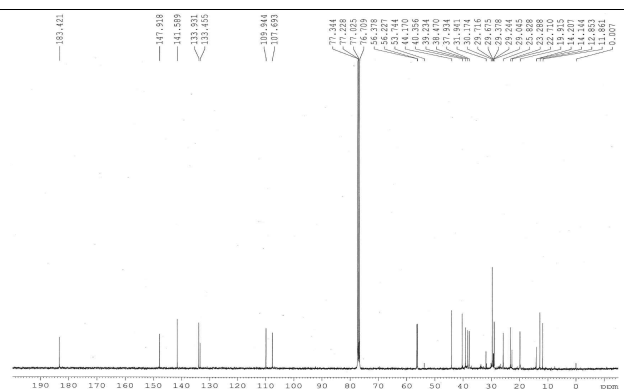


<그림 3-136. Compound 8의 구조>



<그림 3-137.

¹H-NMR spectrum of compound 8>

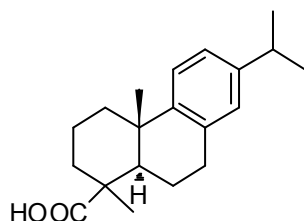


<그림 3-138.

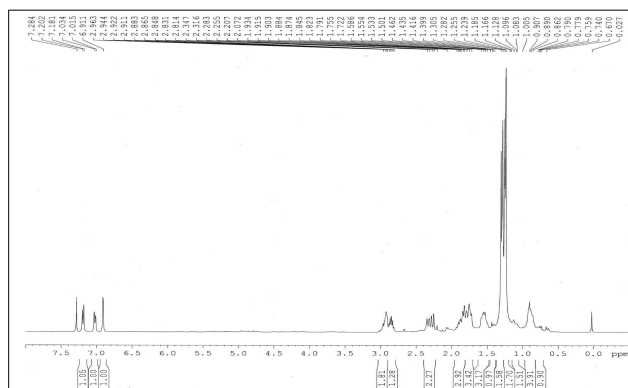
¹³C-NMR spectrum of compound 8>

⑨ Identification of compound 9 (dehydroabietic acid)⁸⁾

- White powder; ¹H-NMR (CDCl₃, 700 MHz) δ 7.19 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-11), 7.02 (1H, d, *J* = 8.4, 2.1 Hz, H-12), 6.91 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, H-14), 2.85 (1H, septet, H-15), 1.30 (3H, s, H-18), 1.24 (3H, s, H-20), 1.25 (6H, d, *J* = 6.4 Hz, H-16 and 17); ¹³C-NMR (CDCl₃, 175 MHz) spectral data are shown in Table 2; ESIMS (positive) *m/z* 301 [M+H]⁺; ESIMS (negative) *m/z* 299 [M-H]⁻.

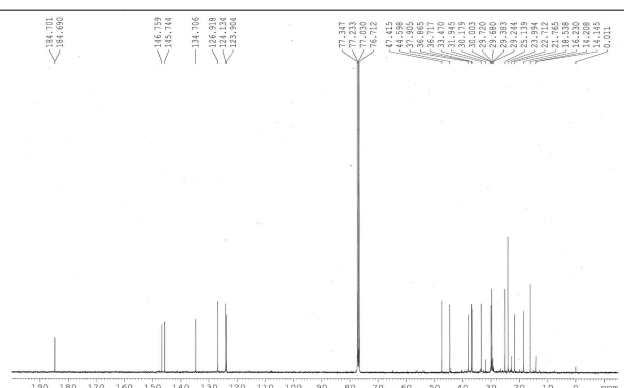


<그림 3-139. Compound 8의 구조>



<그림 3-140.

¹H-NMR spectrum of compound 9>



<그림 3-141.

¹³C-NMR spectrum of compound 9>

<表 3-55. ^1H - and ^{13}C -NMR Data of Compounds 8 and 9>

No.	8		9	
	δ_{H} mult., (J Hz)	δ_{C}	δ_{H} mult., (J Hz)	δ_{C}
1		39.2	1.52 m, 2.37 m	37.9
2		25.8	1.72 m, 1.93 m	18.5
3		37.9	1.71 m, 1.86 m	36.7
4		44.2		47.4
5		56.2	2.26 dd (12.3, 1.8)	44.6
6		19.9	1.58 m, 1.90 m	21.8
7		38.5	2.90 m, 2.96 m	30.0
8		147.9		134.7
9		56.4		146.8
10		40.4		36.9
11		23.3	7.19 d (8.4)	124.1
12	5.43 t (6.4)	133.9	7.02 dd (8.4, 2.1)	123.9
13		133.5		145.7
14	6.35 dd (17.6, 10.8)	141.6	6.91 d (2.1)	126.9
15	5.07 d (17.6), 4.90 d (10.8)	109.9	2.85 septet	33.5
16	1.77 s	11.9	1.25 d (6.4)	24.0
17	4.86 s, 4.49 s	107.7	1.25 d (6.4)	24.0
18	1.27	29.1	1.30 s	16.2
19		183.4		184.7
20	0.67 s	12.9	1.24 s	25.1

^a Measured at 700 and 175 MHz; obtained in CDCl_3 with TMS as an internal standard. The assignments were based on ^1H - ^1H COSY, HSQC, and HMBC experiments.

6. 곰솔의 지표성분 설정

가. 지표성분 : dehydroabietic acid

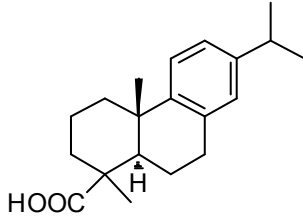
(1) Dehydroabietic acid는 *Pinus*속에서 나온 물질 중에서 휘발성 물질이 증발되고 남은 천연 수지인 송진(松津)에서 발견되는 디테르펜 계열 화합물로 항염증 효과뿐만 아니라 당뇨와 고지혈증을 개선하는 효과가 있는 것으로 알려져 있음.

(2) 곰솔의 주요 구성성분

dehydroabietic acid은 곰솔의 특정 성분임.

Scientific Name	Major Constituents
<i>Pinus Thunbergii</i>	β -sitosterol, rutin, castasterone, typhasterol, dehydroabietic acid , ampullicin, phyllocladene

(3) dehydroabietic acid 구조

구조	
분자식	$C_{20}H_{28}O_2$
CAS RN	1740-19-8
분자량	300

7. 곰솔 지표성분 함량 분석 : 시험법 Validation

가. 목적

- 곰솔의 기준 및 시험방법을 확립하고 이에 대한 시험법 검증

나. 대상

- 곰솔 추출물, dehydroabietic acid 표준품 (CAS number : 1740-19-8).

다. 시험법 validation 방법

- (1) 밸리데이션 시험항목 대상물질 : 곰솔잎 추출물의 지표성분인 dehydroabietic acid 함량.
- (2) 밸리데이션 시험항목 : 기준 및 시험항목에 기재된 시험법 중 함량시험에 대한 직선성, 정확성, 정밀성, 피크의 유지시간 및 면적에 대한 재현성에 대한 시험을 시험하였다.
- (3) 시료전처리 조건 및 분석기기조건

함량시험에 대한 시료전처리조건 및 분석기기 조건은 자사에서 설정한 기준 및 시험방법에 기술한 조건으로 시험함.

<표 3-56. 분석기기 조건>

컬럼	Kromasil 100-5C18 (4.6 × 250mm, 5 μ m)	
이동상	A : 0.05% TFA in H ₂ O B : 아세토니트릴	
검출기	자외부흡광광도계 (측정파장 : 210nm)	
유속	1.0 mL/min	
주입량	10 μ l	
사용한 HPLC System	Agilent 1100-DAD	

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	30	70
30	30	70
31	0	100
60	0	100

post time : 10min

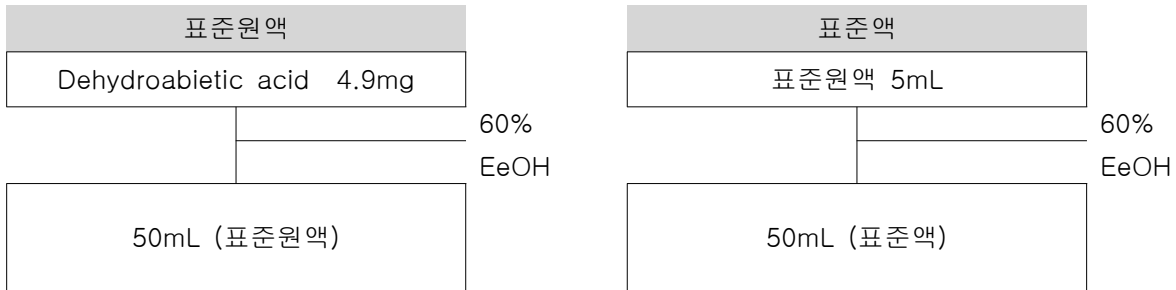
라. 밸리데이션 시험방법 및 결과

(1) 특이성 시험

(가) 시험 방법

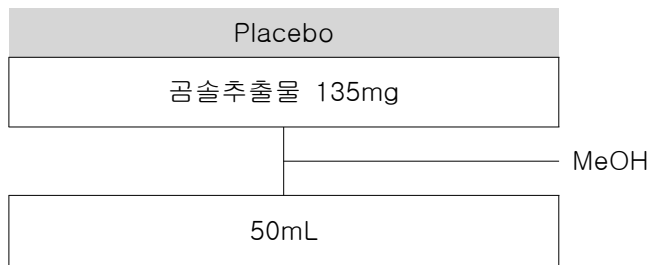
① Blank의 확인 : 60% EtOH이 본 함량시험법에 영향을 미치지 않음을 확인하기 위하여 함량시험법의 기기조건에 따라 시험하여 얻어진 피크의 유지시간이 Dehydroabietic acid의 피크와 겹치지 않음을 확인함.

② Dehydroabietic acid 표준액의 조제: Dehydroabietic acid 4.9mg을 정밀히 달아 60% EtOH로 녹여 정확히 50mL로 한다. 이 액을 표준원액이라 함. 표준원액 5mL을 60% EtOH로 50mL로 한다. 이 액을 표준액이라 함.



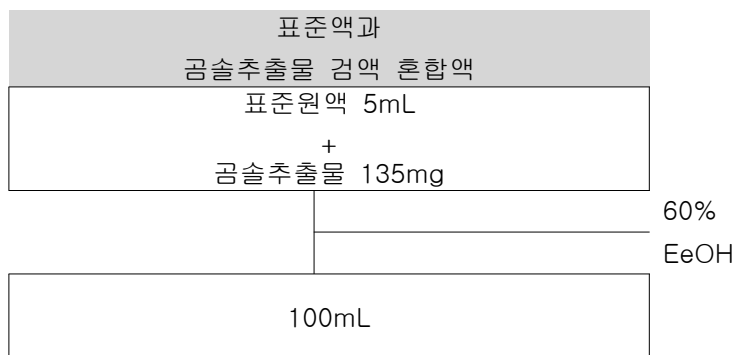
<도식 3-15. Dehydroabietic acid 표준액 조제>

③ 곰솔 추출물 (검액의 조제) : 곰솔추출물 약 135mg을 정밀하게 취하여 60% EtOH로 정확히 50mL로 함. 이 액을 가지고 함량기시법의 기기조건에 따라 시험하여 회수율을 측정한다.



<도식 3-16. 곰솔 추출물 검액 조제>

④ 표준액과 곰솔추출물 검액 혼합물에서의 회수율 : 위에서 제조한 표준원액 5mL과 곰솔추출물 135mg을 취하여 60% EtOH로 정확히 100mL로 함. 이 액을 가지고 함량시험법의 기기조건에 따라 시험하여 회수율을 측정함.



<도식 3-17. Dehydroabietic acid 표준액과 곰솔 추출물 검액 혼합액 조제>

(나) 시험 결과

Dehydroabiestic acid은 완전히 분리되며 피크 유지시간은 19.009분이고 Blank 에서는 Dehydroabiestic acid과 겹치는 피크가 없었으며 Dehydroabiestic acid 표준액 + 곰솔추출물 시험 결과 그의 회수율은 98.29%로서 양호한 결과를 얻었음. 위의 결과를 종합 했을 때 본 분석방법 은 제품에서 Dehydroabiestic acid을 측정하는데 있어서 특이성이 있음을 확인 할 수 있음.

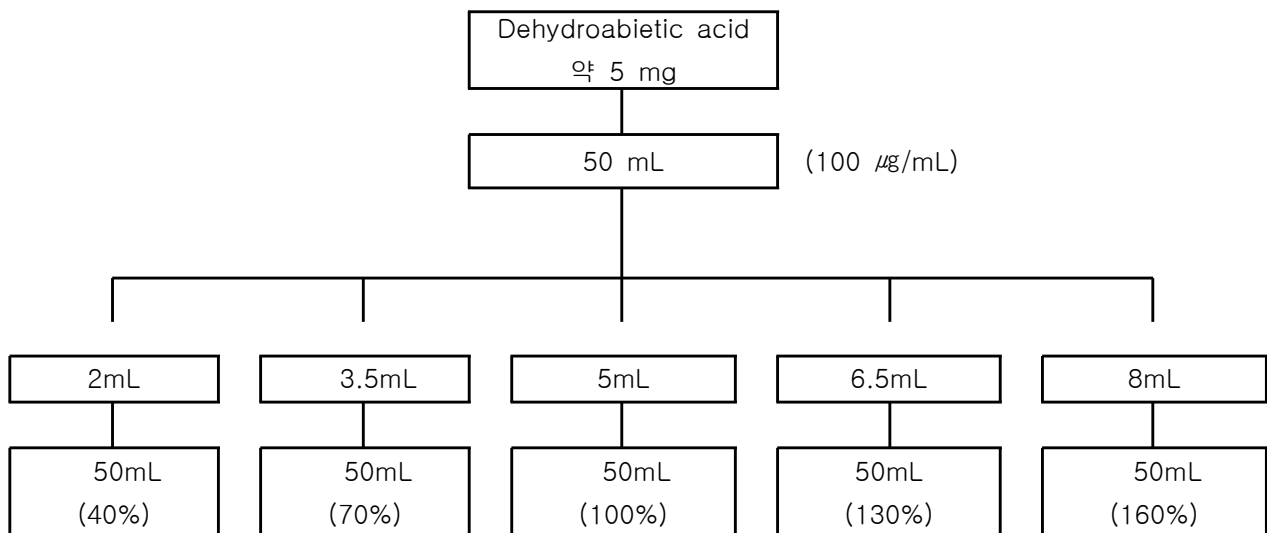
<표 3-57. 특이성 시험결과>

특이성시험결과	RT	피크면적	회수율(%)
Blank (60% EtOH)	-	-	-
Dehydroabiestic acid 표준액	19.009	294.01569	-
곰솔추출물	18.988	324.08850	0.38
Dehydroabiestic acid 표준액 + 곰솔추출물	19.046	303.32819	98.26

(2) 직선성 시험 (STD)

(가) 곰솔추출물 중 Dehydroabiestic acid 함량시험

- ① Dehydroabiestic acid 표준품을 가지고 함량시험농도(10 μ g/mL)의 40 ~ 160% 범위에서의 직선성을 확인함.
- ② 직선성 시험용액의 조제 : Dehydroabiestic acid 표준품 약 5mg을 정확히 취하여 60% EtOH을 넣어 50mL로 하고 (100 μ g/mL), 이를 각각 2.0mL, 3.5mL, 5.0mL, 6.5mL, 8.0mL를 정확히 취한 다음 여기에 60% EtOH을 넣어 정확히 50mL로 함. 이는 각각 함량시험에서 기준농도의 40%, 70%, 100%, 130%, 160%에 해당하는 농도임.



<도식 3-18. 직선성 시험용액 조제>

☞ 각 표준품의 실제 취한 양 (표준품의 순도 : 96.0%)

Group 1 Dehydroabietic acid : 5.0 mg × 순도 96.0 % = 4.8 mg

Group 2 Dehydroabietic acid : 5.0 mg × 순도 96.0% = 4.8 mg

Group 3 Dehydroabietic acid : 5.0 mg × 순도 96.0 % = 4.8 mg

(나) 직선성시험 (STD) 결과

(나-1) Group 1의 직선성시험결과 : Dehydroabietic acid을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

① 피크면적 및 검량선식

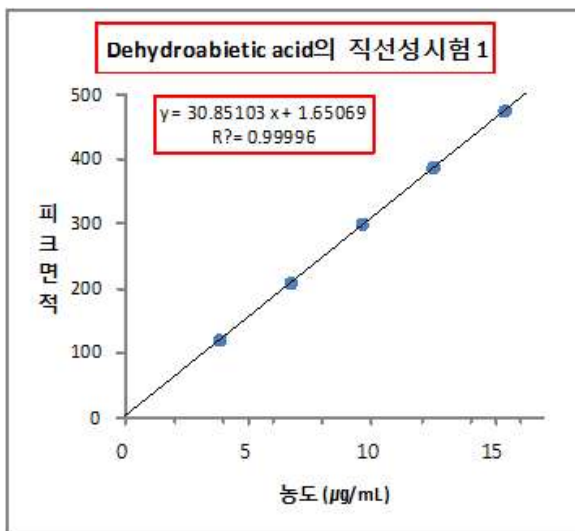
<표 3-58. Dehydroabietic acid 피크면적 및 검량선식 group 1>

Group 1	Dehydroabietic acid		
	mL	농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)	피크면적
Cal 1 - 1	2.0	3.84	119.87192
Cal 1 - 2	3.5	6.72	208.32724
Cal 1 - 3	5.0	9.60	299.36343
Cal 1 - 4	6.5	12.48	386.50009
Cal 1 - 5	8.0	15.36	475.04037
기울기	30.85103		
y 절편	1.65069		
R^2	0.99996		

검량선식

$$\text{Group 1 } y = 30.85103 x + 1.65069 \quad (R^2 = 0.99996)$$

② 검량선 그래프



<그림 3-142. Dehydroabietic acid 검량선 그래프 group 1>

(나-2) Group 2의 직선성시험결과 : Dehydroabiatic acid을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

① 피크면적 및 검량선식

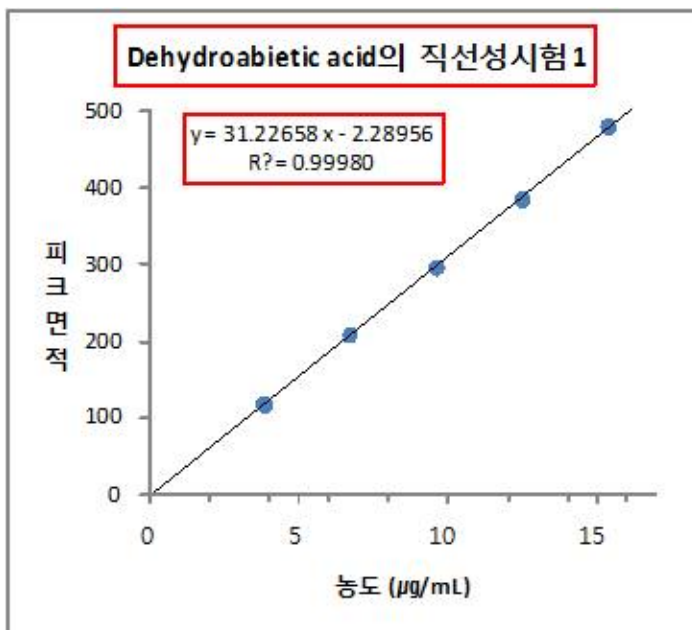
<표 3-59. Dehydroabiatic acid 피크면적 및 검량선식 group 2>

Group 1	Dehydroabiatic acid		
	mL	농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)	피크면적
Cal 2 - 1	2.0	3.84	118.08168
Cal 2 - 2	3.5	6.72	208.69106
Cal 2 - 3	5.0	9.60	296.18863
Cal 2 - 4	6.5	12.48	384.75330
Cal 2 - 5	8.0	15.36	479.71329
기울기	31.22658		
y 절편	-2.28956		
R^2	0.99980		

검량선식

Group 2 $y = 31.22658 x - 2.28956$ ($R^2 = 0.99980$)

② 검량선 그래프



<그림 3-143. Dehydroabiatic acid 검량선 그래프 group 2>

(나-3) Group 3의 직선성시험결과 : Dehydroabiatic acid을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을

알 수 있었음.

① 피크면적 및 검량선식

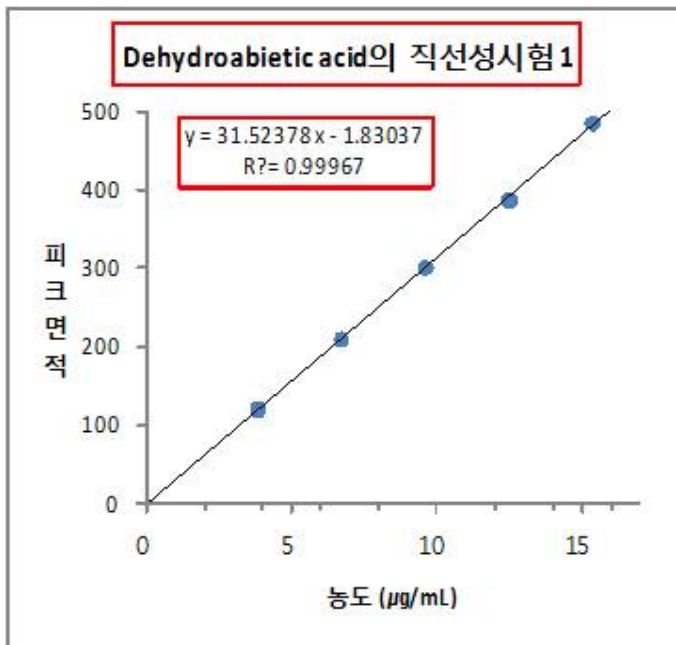
<표 3-60. Dehydroabiatic acid 피크면적 및 검량선식 group 3>

Group 1	Dehydroabiatic acid		
	mL	농도($\mu\text{g}/\text{mL}$)	피크면적
Cal 3 - 1	2.0	3.84	120.64602
Cal 3 - 2	3.5	6.72	209.27199
Cal 3 - 3	5.0	9.60	301.02597
Cal 3 - 4	6.5	12.48	387.64240
Cal 3 - 5	8.0	15.36	485.40326
기울기	31.52378		
y 절편	-1.83037		
R ²	0.99967		

검량선식

Group 3 $y = 31.52378 x - 1.83037$ ($R^2 = 0.99967$)

② 검량선 그래프



<그림 3-144. Dehydroabiatic acid 검량선 그래프 group 3>

(라) Dehydroabietic acid의 직선성시험 종합결과

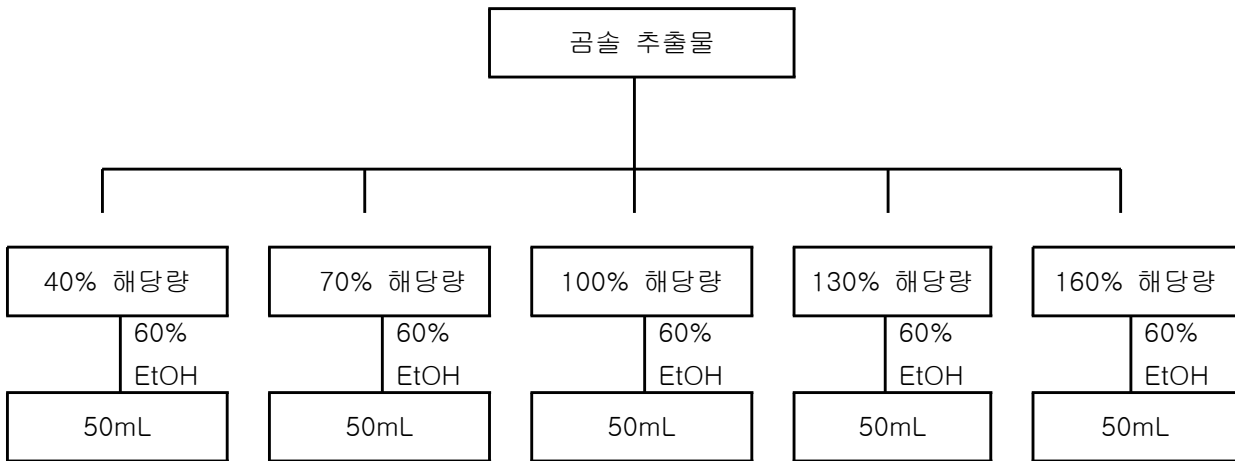
<표 3-61. Dehydroabietic acid의 직선성 시험 종합결과>

직선성시험 종합결과	Dehydroabietic acid		
	기울기	y 절편	R ²
직선성시험 1	30.85103	1.65069	0.99996
직선성시험 2	31.22658	-2.28956	0.99980
직선성시험 3	31.52378	-1.83037	0.99967
평균	31.20046	-0.82308	0.99981
표준편차	0.337133	2.15462	0.00015
종합 검량선	$y = 31.20046 x - 0.82308 (R^2 = 0.99981)$		

(3) 직선성 시험(SA)

(가) 곰솔 추출물 중 Dehydroabietic acid 함량시험

- ① 곰솔 추출물을 가지고 함량시험농도의 40 ~ 160% 범위에서의 직선성을 확인함.
- ② 직선성 시험용액의 조제 : 곰솔 추출물을 각각 약 40%, 70%, 100%, 130%, 160%에 해당하는 양을 취한 다음 60% 에탄올에 녹여 50mL로 함.



<도식 3-19. 곰솔 추출물 직선성 시험용액 조제>

☞ 각 곰솔 추출물의 실제 취한 양

Group 1 곰솔 추출물 : 55.0mg, 94.1mg, 135.0mg, 172.0mg, 214.9mg

Group 2 곰솔 추출물 : 56.7mg, 93.6mg, 136.4mg, 172.2mg, 221.4mg

Group 3 곰솔 추출물 : 53.7mg, 92.4mg, 137.8mg, 174.3mg, 224.4mg

(나) 직선성시험 (SA) 결과

(나-1) Group 1의 직선성시험결과 : 곰솔 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있음.

① 피크면적 및 검량선식

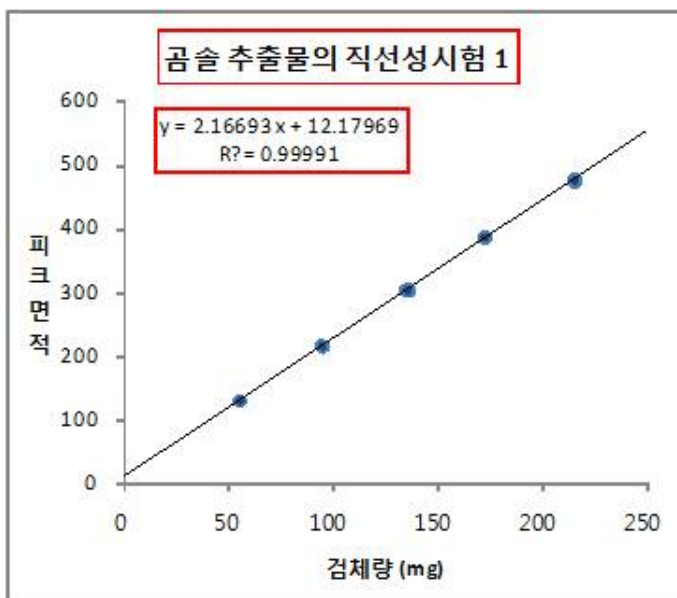
<표 3-62. 곰솔 추출물 직선성 시험결과 group 1>

Group 1	곰솔 추출물	
	mg	피크면적
Cal 1 - 1	55.0	130.64331
Cal 1 - 2	94.1	216.54398
Cal 1 - 3	135.0	304.40143
Cal 1 - 4	172.0	386.86719
Cal 1 - 5	214.9	476.45346
기울기	2.16693	
y 절편	12.17969	
R^2	0.99991	

검량선식

Group 1 $y = 2.16693 x + 12.17969$ ($R^2 = 0.99991$)

② 검량선 그래프



<그림 3-145. 곰솔 추출물 직선성 시험 그래프 group 1>

(나-2) Group 2의 직선성시험결과 : 곰솔 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

① 피크면적 및 검량선식

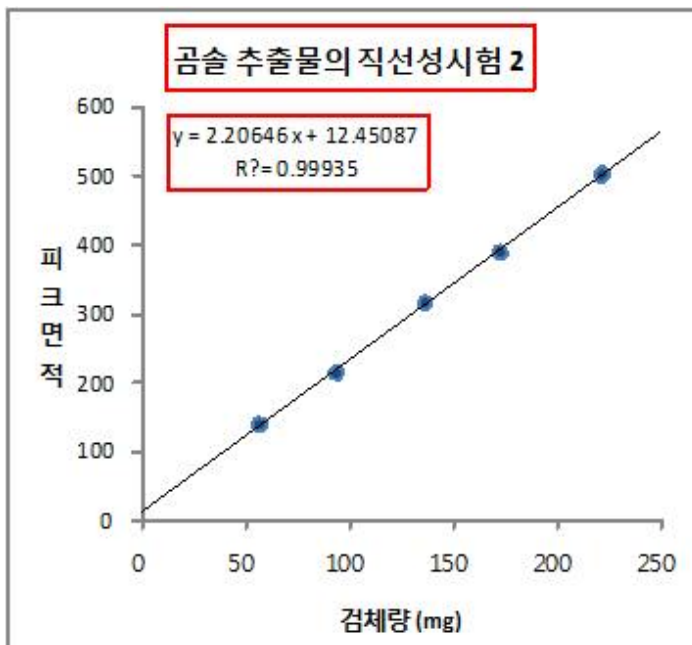
<표 3-63. 곰솔 추출물 직선성 시험결과 group 2>

Group 2	곰솔 추출물	
	mg	피크면적
Cal 2 - 1	56.7	140.48218
Cal 2 - 2	93.6	214.42068
Cal 2 - 3	136.4	316.48849
Cal 2 - 4	172.2	389.12970
Cal 2 - 5	221.4	502.78940
기울기	2.20646	
y 절편	12.45087	
R^2	0.99935	

검량선식

Group 2 $y = 2.20646 x + 12.45087$ ($R^2 = 0.99935$)

② 검량선 그래프



<그림 3-146. 곰솔 추출물 직선성 시험 그래프 group 2>

(나-3) Group 3의 직선성시험결과 : 곰솔 추출물을 각각의 농도로 조제하고 HPLC에 주입하여 검량선을 작성하였을 때 그의 상관계수의 제곱(R^2)은 0.99 이상으로 직선성이 있음을 알 수 있었음.

① 피크면적 및 검량선식

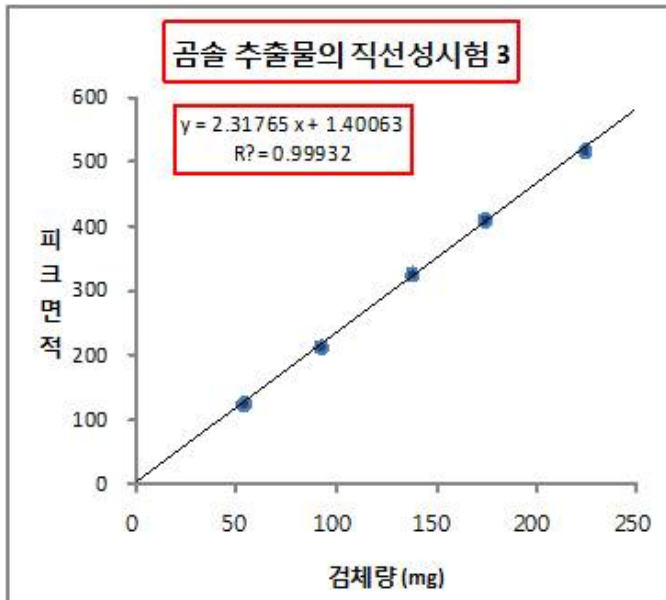
<표 3-64. 곰솔 추출물 직선성 시험결과 group 3>

Group 3	곰솔 추출물	
	mg	피크면적
Cal 3 - 1	53.7	124.55801
Cal 3 - 2	92.4	212.78506
Cal 3 - 3	137.8	325.14224
Cal 3 - 4	174.3	409.53439
Cal 3 - 5	224.4	517.01178
기울기	2.31765	
y 절편	1.40063	
R^2	0.99932	

검량선식

Group 3 $y = 2.31765 x + 1.40063$ ($R^2 = 0.99932$)

② 검량선 그래프



<그림 3-147. 곰솔 추출물 직선성 시험 그래프 group 3>

(다) 곰솔 추출물의 직선성 시험 종합결과

<표 3-65. 곰솔 추출물 직선성시험 종합결과>

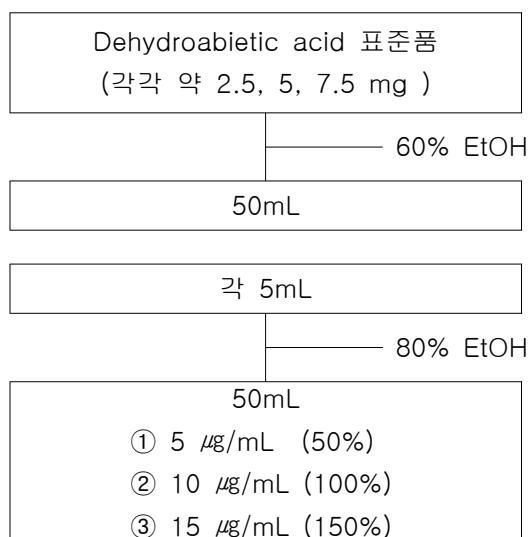
직선성시험 종합결과	곰솔 추출물		
	기울기	y 절편	R ²
직선성시험 1	2.16693	12.17969	0.99991
직선성시험 2	2.20646	12.45087	0.99935
직선성시험 3	2.31765	1.40063	0.99932
평 균	2.23035	8.67706	0.99953
표준편차	0.078147	6.30303	0.00033
종합 검량선	$y = 2.23035 x + 8.67706 (R^2 = 0.99953)$		

(4) 정확성 및 정밀성 시험

(가) 곰솔 추출물 중 Dehydroabiatic acid의 정확성 및 정밀성

① Dehydroabiatic acid 표준품을 가지고 기준 및 시험방법에 기재된 방법으로 기준농도의 50%, 100%, 150%에 해당하는 농도의 용액을 조제하고 동일한 HPCL조건으로 6회 반복 주입하여 시험하여 얻은 피크면적 및 피크의 유지시간을 가지고 유지시간 및 피크면적에 대한 재현성을 확인하고 정밀성을 확인하였음. 또한 이 시험에서 얻은 피크면적을 위의 직선성시험 결과에서 얻은 회귀방정식에 대입하여 실제의 농도를 계산하였으며 이를 이론농도에 대한 회수율을 구하여 위에서 얻은 회귀방정식의 정확성을 확인하였음.

② 정확성 및 정밀성 시험용액 조제



<도식 3-20. 곰솔 정확성 및 정밀성 시험용액 조제>

③ 시험결과에 대한 평가방법

- 위의 시험방법의 “2) 정확성, 정밀성, 피크의 유지시간 및 면적에 대한 재현성시험을 위한 시험액”을 가지고 HPLC에 6회 반복주입하여 얻어진 피크의 유지시간 및 면적을 가지고 계산하였을 때 상대표준편차는 2.0%이하 이어야 하며, 회수율은 95.0% - 105.0%이어야 함.

(나) 곰솔 추출물 중 Dehydroabiatic acid의 정확성 및 정밀성 결과

Dehydroabiatic acid의 회수율이 95.0 ~ 105.0 % 이내의 아주 양호한 결과를 얻었고 회수율의 상대표준편차가 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정확성이 있음을 알 수 있었음.

① 피크면적을 위의 검량선식에 대입하여 얻어진 Dehydroabiatic acid의 정확성과 회수율 (%)

<표 3-66. 곰솔 정확, 정밀성 결과 1-3>

	Dehydroabiatic acid				
	취한 양 (mg)	이론농도 (µg/mL)	피크면적	실제농도 (µg/mL)	회수율 (%)
정확성 - 1 (50%)	2.5	4.42	137.12364	4.4213	100.12
			135.13615	4.3576	98.68
			135.45560	4.3678	98.91
			135.15924	4.3583	98.69
			137.32494	4.4278	100.27
			137.02856	4.4183	100.05
			평균		99.45
		표준편차		0.77	
		RSD (%)		0.77	

	Dehydroabiatic acid				
	취한 양 (mg)	이론농도 (µg/mL)	피크면적	실제농도 (µg/mL)	회수율 (%)
정확성 - 2 (100%)	5.0	9.60	299.94272	9.6398	100.41
			299.83401	9.6363	100.38
			299.11819	9.6134	100.14
			298.83688	9.6043	100.05
			303.21579	9.7447	101.51
			298.46689	9.5925	99.92
			평균		100.40
		표준편차		0.57	
		RSD (%)		0.57	

	Dehydroabietic acid				
	취한 양 (mg)	이론농도 ($\mu\text{g/mL}$)	피크면적	실제농도 ($\mu\text{g/mL}$)	회수율 (%)
정확성 - 3 (1500%)	7.9	15.17	472.39587	15.1670	99.99
			477.88403	15.3249	101.15
			476.29190	15.2919	100.82
			471.95129	15.1528	99.90
			473.21912	15.1934	100.17
			470.12262	15.0942	99.51
				평균	100.26
				표준편차	0.61
				RSD (%)	0.61

② Dehydroabietic acid의 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성 결과 : Dehydroabietic acid 피크면적의 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정밀성과 재현성이 있음을 알 수 있었음.

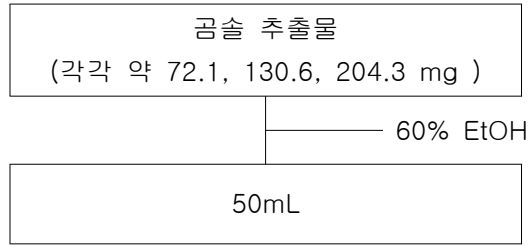
<표 3-67. Dehydroabietic acid 피크 면적에 대한 정밀성 및 재현성>

시험액의 농도	Dehydroabietic acid					
	70%		100%		130%	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area
1회	18.893	137.12364	18.864	299.94272	18.871	472.39587
2회	18.893	135.13615	18.860	299.83401	18.870	477.88403
3회	18.883	135.45560	18.869	299.11819	18.874	476.29190
4회	18.877	135.15924	18.876	298.83688	18.875	471.95129
5회	18.871	137.32494	18.870	303.21579	18.868	473.21912
6회	18.864	137.02856	18.872	298.46689	18.873	470.12262
평균	18.880	136.20469	18.869	299.90241	18.872	473.64414
표준편차	0.012	1.06	0.006	1.72	0.003	2.90
RSD (%)	0.06	0.78	0.03	0.57	0.01	0.61
시험기준 RSD (%)	2.0 % 이하					

(다) 곰솔 추출물의 정확성 및 정밀성 시험

① 곰솔 추출물을 가지고 기준 및 시험방법에 기재된 방법으로 기준농도의 50%, 100%, 150%에 해당하는 농도의 용액을 조제하고 동일한 HPCL 조건으로 6회 반복 주입하여 시험하여 얻은 피크면적 및 피크의 유지시간을 가지고 유지시간 및 피크면적에 대한 재현성을 확인하고 정밀성을 확인하였음.

② 정확성 및 정밀성 시험용액 조제



<도식 3-21. 곰솔 추출물 정확성 및 정밀성 시험용액 조제>

③ 시험결과에 대한 평가방법

- 위의 시험방법의 “2) 정확성, 정밀성, 피크의 유지시간 및 면적에 대한 재현성시험을 위한 시험액”을 가지고 HPLC에 6회 반복주입하여 얻어진 피크의 유지시간 및 면적을 가지고 계산하였을 때 상대표준편차는 2.0%이하 이어야 하며, 회수율은 95.0% - 105.0%이어야 함.

(라) 곰솔 추출물의 정확, 정밀성시험 결과 : 곰솔 추출물의 회수율이 95.0 ~ 105.0 % 이내의 아주 양호한 결과를 얻었고 회수율의 상대표준편차가 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정확성이 있음을 알 수 있었음.

① 피크면적을 위의 검량선식에 대입하여 얻어진 곰솔 추출물의 정확성과 회수율 (%)

<표 3-68. 곰솔 추출물 정확, 정밀성 시험결과 1-3>

	곰솔 추출물				
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)	
정확성 - 1 (50%)	72.1	168.70212	71.7489	99.51	
		168.32573	71.5802	99.28	
		170.64062	72.6181	100.72	
		169.41800	72.0699	99.96	
		168.56767	71.6886	99.43	
		169.45242	72.0853	99.98	
				평균	99.81
				표준편차	0.53
				RSD (%)	0.53

	곰솔 추출물				
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)	
정확성 - 2 (100%)	130.6	297.40747	129.4553	99.12	
		297.55682	129.5223	99.17	
		301.61365	131.3412	100.57	
		296.94061	129.2460	98.96	
		297.87299	129.6640	99.28	
		297.15335	129.3414	99.04	
				평균	99.36
				표준편차	0.60
				RSD (%)	0.61

	곰솔 추출물				
	취한 양 (mg)	피크면적	실제량 (mg)	회수율 (%)	
정확성 - 3 (150%)	204.3	464.14966	204.2159	99.96	
		465.30927	204.7359	100.21	
		458.58466	201.7208	98.74	
		460.39090	202.5307	99.13	
		462.44211	203.4503	99.58	
		461.79657	203.1609	98.44	
				평균	99.51
				표준편차	0.54
				RSD (%)	0.54

② 곰솔 추출물의 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성 결과 : 곰솔 추출물 피크면적의 상대표준 편차는 모두 2.0% 이하로서 본 시험방법은 정밀성과 재현성이 있음을 알 수 있었음.

<표 3-69. 곰솔 추출물 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성>

시험액의 농도	곰솔 추출물					
	70%		100%		130%	
	RT	Area	RT	Area	RT	Area
1회	18.912	168.70212	18.998	297.40747	19.007	464.14966
2회	18.906	168.32573	18.989	297.55682	18.963	465.30927
3회	18.911	170.64062	19.006	301.61365	18.952	458.58466
4회	18.919	169.41800	18.992	296.94061	18.949	460.39090
5회	18.956	168.56767	19.000	297.87299	18.943	462.44211
6회	18.980	169.45242	18.995	297.15335	18.927	461.79657
평균	18.931	169.18443	18.997	298.09082	18.957	462.11220
표준편차	0.030	0.85	0.006	1.76	0.027	2.45
RSD (%)	0.16	0.50	0.03	0.59	0.14	0.53
시험기준 RSD (%)	2.0 % 이하					

(5) 검출한계 (Detection Limit, DL) 및 정량한계 (Quantitation Limit, QL)

- Dehydroabietic acid의 직선성 시험용액 3개의 Group을 가지고 각 Group에 대한 검량선을 작성하여 각각의 검량선의 기울기와 y 절편을 구하였다.
- 이들 각각 3개의 검량선에서 기울기의 평균값과 y 절편에 대한 표준편차를 구하여 ICH에서 규정한대로 아래의 식으로 검출한계 및 정량한계를 계산하였다.

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times y \text{ 절편의 표준편차}}{\text{검량선 기울기의 평균값}}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times y \text{ 절편의 표준편차}}{\text{검량선 기울기의 평균값}}$$

(가) Dehydroabietic acid의 검량선

<표 3-70. Dehydroabietic acid의 검량선>

① Group 1	$y = 30.85103 x + 1.65069$ ($R^2=0.99996$)
② Group 2	$y = 31.22658 x - 2.28956$ ($R^2=0.99980$)
③ Group 3	$y = 31.52378 x - 1.83037$ ($R^2=0.99967$)
종합 검량선	$y = 31.20046 x - 0.82308$ ($R^2=0.99981$)
검량선 기울기의 평균값	31.20046
종합 검량선의 y 절편의 표준편차	2.15462

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times 2.15462}{31.20046} = 0.69 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times 2.15462}{31.20046} = 0.23 \mu\text{g/mL}$$

(나) 곰솔 추출물의 검량선

<표 3-70. 곰솔 추출물의 검량선>

① Group 1	$y = 2.16693 x + 12.17969$ ($R^2=0.99991$)
② Group 2	$y = 2.20646 x + 12.45087$ ($R^2=0.99935$)
③ Group 3	$y = 2.31765 x + 1.40063$ ($R^2=0.99932$)
종합 검량선	$y = 2.23035 x + 8.67706$ ($R^2=0.99953$)
검량선 기울기의 평균값	2.23035
종합 검량선의 y 절편의 표준편차	6.30303

$$\text{정량한계 (QL)} = \frac{10 \times 6.30303}{2.23035} = 28.26 \text{ mg/50mL}$$

$$\text{검출한계 (DL)} = \frac{3.3 \times 6.30303}{2.23035} = 9.33 \text{ mg/50mL}$$

(다) 범위 : 곰솔 추출물 중 Dehydroabietic acid 함량시험에 대한 밸리데이션 시험결과 Dehydroabietic acid(4.0 ~ 16.0 $\mu\text{g/mL}$)의 범위에서 직선성 및 재현성이 양호한 결과를 얻었으며 정량한계의 결과를 고려해 보았을 때 Dehydroabietic acid의 정량한계는 0.69 $\mu\text{g/mL}$ 로서 이는 Dehydroabietic acid 함량시험 기준 농도인 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 6.9 %에 해당하는 농도로서, 이 농도의 범위까지 정량성이 있음을 알 수 있었음.

(6) Dehydroabietic acid 밸리데이션시험 결과

곰솔 추출물 중의 Dehydroabietic acid 함량 밸리데이션 시험방법에 대하여 자사에서 선정한 분석방법을 검토한 결과 다음과 같이 요약 할 수 있으며, 곰솔 함량 밸리데이션 시험법은 적합하다고 판단됨.

(가) 특이성시험

- 곰솔 추출물 중의 Dehydroabietic acid 시험용액을 만들 때 사용하는 60% 에탄올에서 Dehydroabietic acid의 피크와 겹침을 확인 한 결과 이들 분석하고자 하는 Dehydroabietic acid 피크가 겹치지 않는다는 것을 확인하였고, 또한 Dehydroabietic acid 표준액, 곰솔추출물에서의 회수율은 95.0 ~ 105.0% 로서 본 시험법은 특이성이 있음을 확인하였음.

(나) 직선성 시험

- 직선성시험에서는 Dehydroabietic acid의 별도 3 Group의 직선성 시험용액을 만들고 이들을 가지고 시험한 결과 3 Group 모두 양호한 직선성을 나타내어 본 시험법의 직선성 기준에 적합한 것으로 나타났음.

- ☞ Dehydroabietic acid (R^2) = 0.99981
- ☞ 곰솔 추출물의 상관계수 (R^2) = 0.99953

(다) 정확성 시험

- 정확성시험에서는 직선성 시험에서 얻은 검량선을 가지고, 정확성 시험용액에서 얻은 피크면적을 대입하여 검량선법에 의해 얻어진 결과 값과, 실제로 취한 양을 가지고 계산한 결과 값을 비교해 보았을 때 그의 회수율은 95.0 ~ 105.0% 의 범위 안에 있으며, 회수율의 상대표준편차가 2.0% 이하로서 본 시험법의 정확성을 확인 할 수 있었음.

(라) 피크유지시간 및 피크면적에 대한 정밀성 및 재현성

- 정확성 및 정밀성의 3가지 시험농도용액(50%, 100%, 150%용액)을 HPLC에 각각 6회 반복 주입하여 얻어진 총 18개의 크로마토그램 중 피크의 유지시간 및 피크면적에 대한 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로서 정밀성을 확인할 수가 있었음.

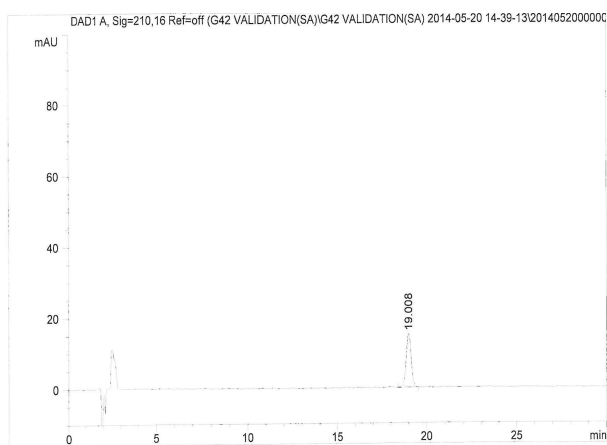
(마) 검출한계 (Detection Limit, DL) 및 정량한계 (Quantitation Limit, QL)

- 위의 직선성시험에서 얻은 검량선을 이용하여 ICH에서 규정하는 방법으로 검출한계(DL) 및 정량한계(QL)을 구하였음.

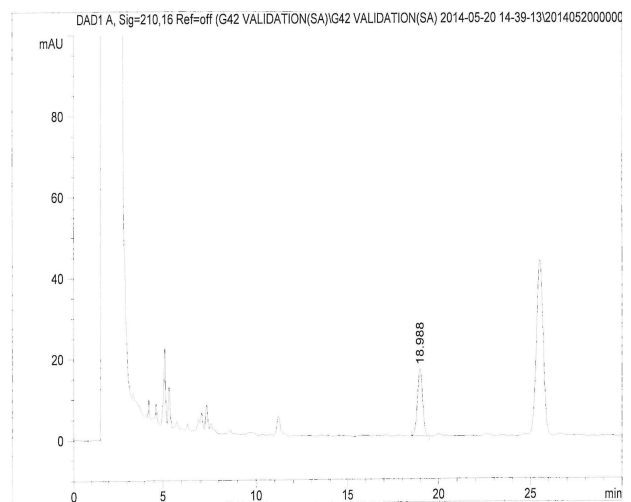
	Dehydroabietic acid	곰솔 추출물
정량한계	0.69 $\mu\text{g/mL}$	28.26 mg/50mL
검출한계	0.23 $\mu\text{g/mL}$	9.33 mg/50mL

(바) 범위

- Dehydroabietic acid(4.0 ~ 16.0 $\mu\text{g/mL}$)의 범위에서 직선성 및 재현성이 양호한 결과를 얻었으며 정량한계의 결과를 고려해 보았을 때 Dehydroabietic acid의 정량한계는 0.69 $\mu\text{g/mL}$ 로서 이는 Dehydroabietic acid 함량시험 기준 농도인 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 6.9 %에 해당하는 농도로서, 이 농도의 범위까지 정량성이 있음을 알 수 있었음.



<그림 3-148. Dehydroabietic acid의 HPLC chromatogram>

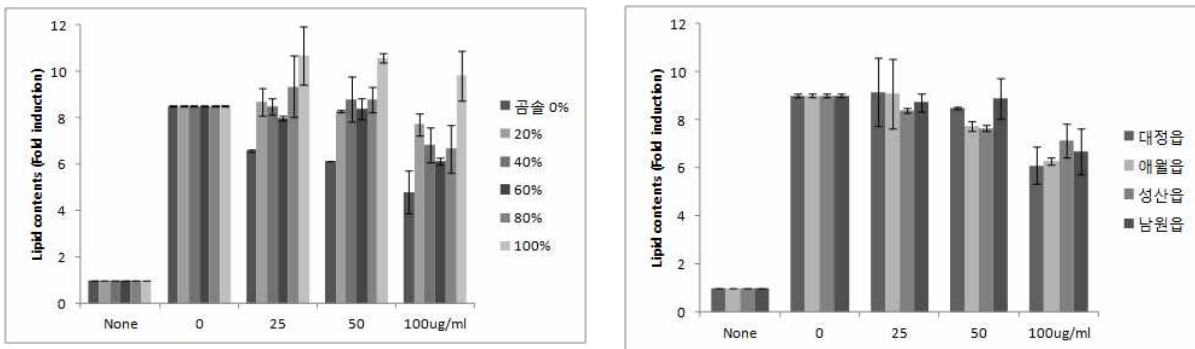


<그림 3-149. 곰솔추출물의 HPLC chromatogram>

8. 곰솔 추출 시료에 대한 세포내 항비만 효과 (*in vitro*)

가. 곰솔 추출물의 농도별, 산지별 지방세포 분화억제 효과 측정 결과

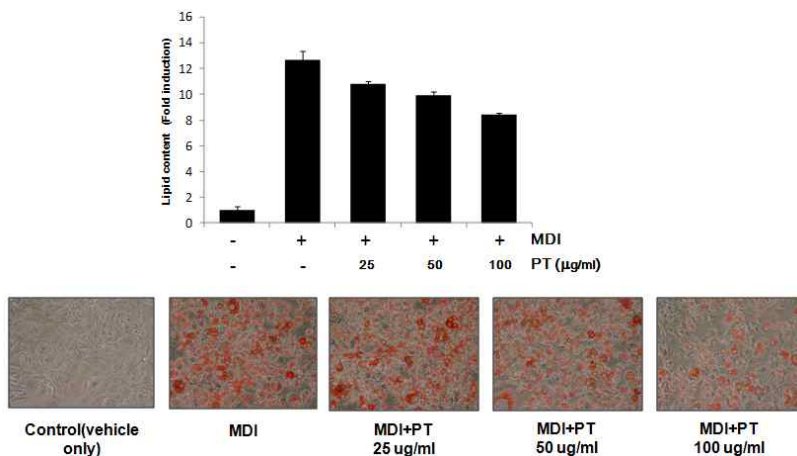
(1) 곰솔 추출물을 농도별로 분획하여 지방분화 억제 활성을 측정한 결과 물 추출물이 효능이 가장 좋았으나 수율 등을 고려하여 2번째로 효능이 좋은 60% 에탄올 추출물을 선정하였음. 그 다음 곰솔 60% 에탄올 추출물 산지별 효능을 알아보기 위해 마우스의 전구지방세포인 3T3-L1 세포주를 이용하여 지방 세포로의 분화억제 실험을 수행한 결과, 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 곰솔에탄올 추출물은 산지별로 효능이 우수한 것은 관찰할 수 없었음.



<그림 3-150. The effects of extracts of *Pinus thunbergii* on differentiation in 3T3-L1 cells>

나. 곰솔 60% 주정 pilot 추출물 지방세포 분화억제 효과

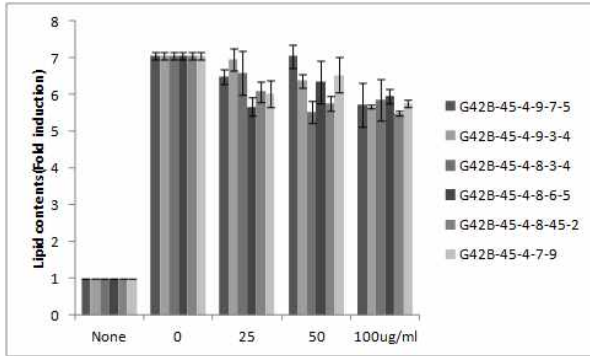
최종 선별된 곰솔의 60% 주정 추출물을 대량 추출을 통해 얻어 이에 대해 지방세포 분화 억제 활성을 측정하였음. 마우스의 전구지방세포인 3T3-L1 세포주를 이용하여 지방 세포로의 분화억제 실험을 수행한 결과, 분화를 유도한 대조군 세포에 비해 큰 효능이 나타나진 않았으나 농도 의존적으로 곰솔 60% 주정 추출물이 분화를 억제시키는 것으로 나타났음.



<그림 3-151. The effects of 60% ethanol extracts of *Pinus thunbergii* on differentiation in 3T3-L1 cells>

다. 곰솔 추출물에서 분리된 유효물질의 지방세포 분화억제 효과

곰솔 추출물에서 분리된 유효물질 6종 중 전구지방세포에서의 지방을 유도한 후 지방분화 억제 활성을 확인해 본 결과, 지방 분화 억제 효능이 나타나는 유효물질은 없는 것으로 나타났음.



- G42B-45-4-9-7-5 : Isomassonioside B
- G42B-45-4-9-3-4 : dihydrodehydrodiconiferyl alcohol-4-O-β-D-glucopyranoside
- G42B-45-4-8-3-4 : pinusthunbergside A
- G42B-45-4-8-6-5 : Massonioside A
- G42B-45-4-8-45-2 : Schisandriside
- G42B-45-4-7-9 : icariside E4

<그림 3-152. The effect of *Pinus thunbergii* extract on differentiation in 3T3-L1 cells>

9. 곰솔 추출 시료에 대한 동물내 간이독성 및 유효성 평가 결과

가. 3주 반복투여 용량설정 (MTD : Maximum Tolerated Dose)

(1) 실험방법

(가) 최적 추출공정법을 통해 대량생산된 곰솔 60% 주정 추출물을 이용 간이독성평가를 통해 안전하고 유효한 농도를 알아보기 위하여 MTD (Maximum Tolerated Dose) 시험을 진행하였음. C57BL/6 마우스를 이용 곰솔 60% 주정 추출물을 50mg/kg~2000mg/kg의 용량까지 3주간 반복 경구 투여하였음.

<표 3-71. MTD 동물실험 군설정>

Group	Treatment	No. of Mouse
I	Vehicle(Saline)	10
II	곰솔 50mg/kg	10
III	곰솔 100mg/kg	10
IV	곰솔 250mg/kg	10
V	곰솔 500mg/kg	10
VI	곰솔 1000mg/kg	10
VII	곰솔 2000mg/kg	10

(2) 실험결과

(가) 3주 후 체중 변화량과 사망률을 측정한 결과 모든 투여군에서 대조군대비 유의한 체중변화가 나타나지 않았고, 사망한 개체도 발생하지 않았음 (표 3-72).

<표 3-72. 곰솔 추출물 3주 반복 경구 투여 후 체중변화량과 사망률 결과>

Dose	Body Weight(g) (first day)	Body Weight(g) (after 3weeks)	Change in body	Mortality
			Weight at end of Study (g)	
Vehicle	22.4 ± 1.1	25.4 ± 1.5	3.0	0
50mg/kg	22.6 ± 0.9	25.2 ± 1.5	2.6	0
100mg/kg	22.4 ± 1.1	24.8 ± 1.1	2.4	0
250mg/kg	22.3 ± 0.8	24.7 ± 1.4	2.4	0
500mg/kg	22.5 ± 0.7	25.3 ± 1.4	2.8	0
1000mg/kg	22.6 ± 0.7	25.0 ± 1.2	2.5	0
2000mg/kg	22.3 ± 1.2	24.7 ± 1.2	2.4	0

(나) 사망률과 체중감소와 관련된 독성에 대하여 특이한 현상이 관찰되지 않았으며(표 3-72), 각각의 개체의 혈액을 채취해 혈액 내 생화학 수치 변화 및 혈구분석을 진행한 결과 표 3-73과 3-74과 같이 통계적으로 유의한 수치변화는 관찰되지 않았음.

<표 3-73. 공슬 추출물 3주 반복투여 후 혈구분석 결과>

	WBC($\times 10^3/\mu\text{L}$)	RBC($\times 10^6/\mu\text{L}$)	Hemoglobin(g/dL)	Hematocrit(%)
Vehicle	3.8 ± 0.9	10.0 ± 0.6	14.8 ± 0.7	46.6 ± 2.4
50mg/kg	4.0 ± 0.8	10.0 ± 0.5	14.8 ± 0.7	46.8 ± 2.0
100mg/kg	4.1 ± 0.9	10.0 ± 0.5	14.7 ± 0.7	46.3 ± 2.1
250mg/kg	3.9 ± 0.9	10.2 ± 0.4	15.0 ± 0.6	47.4 ± 1.9
500mg/kg	3.6 ± 0.4	9.9 ± 0.3	14.5 ± 0.5	45.8 ± 1.6
1000mg/kg	3.7 ± 0.8	10.1 ± 0.2	14.8 ± 0.3	46.9 ± 1.0
2000mg/kg	4.0 ± 0.7	10.3 ± 0.5	14.9 ± 0.6	47.8 ± 2.2
	MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/dL)	Platelet($\times 10^3/\mu\text{L}$)
Vehicle	46.7 ± 0.5	14.8 ± 0.2	31.8 ± 0.3	1267.9 ± 178.0
50mg/kg	46.7 ± 0.7	14.8 ± 0.2	31.6 ± 0.6	1224.0 ± 79.8
100mg/kg	46.4 ± 0.4	14.7 ± 0.1	31.6 ± 0.2	1176.7 ± 221.1
250mg/kg	46.2 ± 0.4	14.7 ± 0.1	31.8 ± 0.2	1256.3 ± 201.9
500mg/kg	46.3 ± 0.6	14.7 ± 0.2	31.8 ± 0.2	1299.9 ± 126.1
1000mg/kg	46.4 ± 0.2	14.6 ± 0.1	31.6 ± 0.2	1281.8 ± 195.5
2000mg/kg	46.6 ± 0.5	14.5 ± 0.2	31.2 ± 0.3	1344.1 ± 125.7

<표 3-74. 혈장 생화학분석 결과>

	GOT(U/L)	GPT(U/L)	Total Cholesterol(mg/dL)	Triglyceride(mg/dL)
Vehicle	80.31 ± 21.89	21.30 ± 6.57	149.43 ± 9.30	57.42 ± 10.50
50mg/kg	95.54 ± 23.41	21.46 ± 4.13	148.03 ± 9.58	70.80 ± 16.25
100mg/kg	91.24 ± 28.45	23.18 ± 3.48	148.30 ± 9.41	55.11 ± 17.64
250mg/kg	88.12 ± 21.73	20.60 ± 5.37	145.51 ± 16.69	51.62 ± 19.30
500mg/kg	80.20 ± 16.16	21.51 ± 2.99	134.29 ± 13.81	50.44 ± 17.71
1000mg/kg	81.76 ± 16.11	19.08 ± 3.82	142.62 ± 11.55	38.37 ± 11.20
2000mg/kg	81.82 ± 16.03	19.17 ± 3.31	134.19 ± 13.22	40.27 ± 14.01
	HDL(mg/dL)	LDL(mg/dL)	LDH (U/L)	Total Protein(mg/dL)
Vehicle	84.34 ± 5.28	10.42 ± 3.07	171.38 ± 40.54	5.78 ± 0.20
50mg/kg	84.20 ± 4.31	11.35 ± 2.78	165.17 ± 51.84	6.05 ± 0.21
100mg/kg	84.84 ± 4.63	11.94 ± 2.49	158.41 ± 47.32	5.99 ± 0.23
250mg/kg	84.14 ± 6.54	9.05 ± 3.86	155.32 ± 51.71	6.06 ± 0.54
500mg/kg	82.17 ± 7.11	8.33 ± 1.17	161.99 ± 54.94	5.78 ± 0.34
1000mg/kg	84.63 ± 7.53	8.87 ± 2.04	150.50 ± 43.95	5.97 ± 0.30
2000mg/kg	81.93 ± 5.34	8.57 ± 2.19	145.64 ± 32.37	5.81 ± 0.16
	BUN(mg/dL)	Albumin(g/dL)	Total Bilirubin(mg/dL)	Glucose(mg/dL)
Vehicle	33.08 ± 7.17	1.79 ± 0.08	0.17 ± 0.02	139.38 ± 34.30
50mg/kg	35.39 ± 8.44	1.88 ± 0.09	0.18 ± 0.01	120.78 ± 32.95
100mg/kg	30.37 ± 7.49	1.85 ± 0.07	0.17 ± 0.02	128.34 ± 33.26
250mg/kg	30.39 ± 6.05	1.83 ± 0.19	0.17 ± 0.02	123.93 ± 30.73
500mg/kg	30.08 ± 3.73	1.74 ± 0.08	0.21 ± 0.03	116.89 ± 29.68
1000mg/kg	30.71 ± 4.39	1.81 ± 0.11	0.20 ± 0.03	126.32 ± 31.77
2000mg/kg	24.09 ± 4.23	1.76 ± 0.07	0.22 ± 0.02	133.67 ± 22.53

다. DIO I mouse model을 이용한 *in vivo* 항비만 유효성 평가 결과

(1) 실험방법

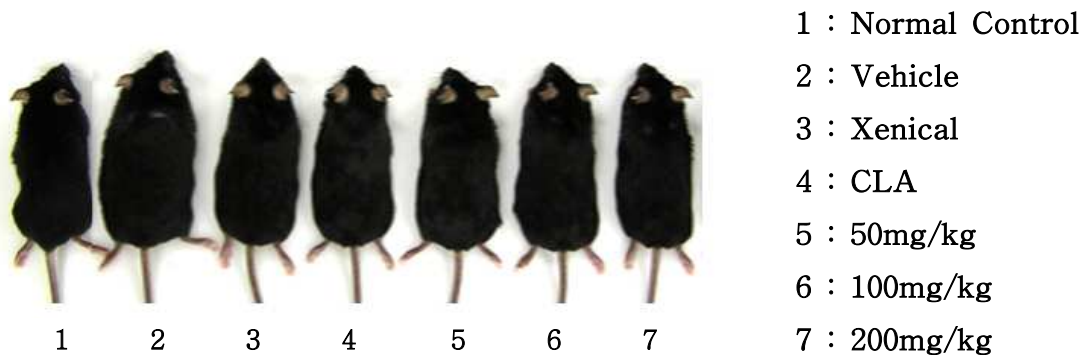
6주령의 C57BL/6 마우스를 체중이 높은 순으로 배열하고 군 간의 평균과 표준편차가 균등하게 되도록 분리한 이후 6주간 고지방 식이 (60%지방식이)와 vehicle, positive controls (제니칼 :현재 시판되는 비만치료제, CLA :콜레스테롤 저하 기능을 나타내는 개별인정형 건강기능식품), 표준화된 곰솔 60% 에탄올 추출물을 농도별로 (50, 100, 200mg/kg) 경구투여 함. 6주간 실험이 진행되었으며 체중은 주 3회 측정하였고 6주 투여 후 동물을 희생하여 복부 및 내장지방과 간을 적출하여 10% Formalin에 고정하여 처리하고, 혈액은 채취하여 혈액분석을 실시함.

<표 3-75. 곰솔 항비만 유효성 평가 군설정>

Group	Treatment	No. of Mouse
I	정상군	10
II	대조군(비만유발군)	10
III	Xenical 6mg/kg	10
IV	CLA 80mg/kg	10
V	곰솔 50mg/kg	10
VI	곰솔 100mg/kg	10
VII	곰솔 200mg/kg	10

(2) 실험결과

6주후 아래와 같이 각각의 군별로 평균적인 결과 값을 나타내는 개체를 선택하여 외형사진을 비교 관찰하였음 (그림 3-153).



<그림 3-153. 곰솔 추출물 투여군과 대조군의 마우스 외형사진 비교 관찰>

(가) 비만유도 마우스를 이용한 곰솔 투여군과 대조군의 체중감소 효능비교

○ 6주간 고지방 식이와 함께 곰솔 추출물을 농도별로 투여한 결과 vehicle 투여군에서는 12.71g의 체중이 증가한데 비해 곰솔 추출물을 50mg/kg의 용량으로 투여한 군에서는 10.45g, 100mg/kg 투여군에서 10.10g, 200mg/kg 투여군에서 8.42g의 체중증가로 대조군 (vehicle 투여군)에 비해 체중억제 비율이 17.78%, 20.53%, 33.75%로 좋은 효과가 관찰되었으며 (표 3-76), 이는 부고환지방, 피하지방, 복막하지방의 지방량 정량결과와도 비슷한 결과로 나타남 (표 3-77).

<표 3-76. 곰솔 투여군과 대조군의 체중감소 효과>

Dose	Body Weight(g) (first day)	Body Weight(g) (after 6weeks)	Change in body Weight at end of study(g)	Inhibition rate(%)
Normal Control	21.4 ± 0.1	26.8 ± 0.3	5.74	-
Vehicle	22.0 ± 0.2	33.8 ± 0.9	12.71	-
Xenical	21.2 ± 0.4	31.4 ± 1.0	10.40	18.18
CLA	21.1 ± 0.6	30.4 ± 1.1	9.39	26.12
50mg/kg	21.5 ± 0.9	31.5 ± 1.1	10.45	17.78
100mg/kg	21.6 ± 0.2	31.1 ± 0.6	10.10	20.53
200mg/kg	21.5 ± 0.8	29.5 ± 0.8	8.42	33.75

<표 3-77. 곰솔 투여군의 피하지방(A), 부고환지방(B), 복막하지방(C) 축적 억제율>

(A) 피하지방 축적 억제율

Dose	Subcutaneous fat weight (g)	Inhibition rate(%)
Normal Control	0.554 ± 0.032	-
Vehicle	1.964 ± 0.157	-
Xenical	1.526 ± 0.200	22.3
CLA	1.802 ± 0.149	8.2
50mg/kg	1.682 ± 0.216	14.3
100mg/kg	1.520 ± 0.150	22.3
200mg/kg	1.321 ± 0.084	32.8

(B) 부고환지방 축적 억제율

Dose	Epididymal fat weight (g)	Inhibition rate(%)
Normal Control	0.453 ± 0.021	-
Vehicle	1.717 ± 0.127	-
Xenical	1.253 ± 0.135	27.0
CLA	1.331 ± 0.121	22.5
50mg/kg	1.413 ± 0.131	17.7
100mg/kg	1.301 ± 0.094	24.2
200mg/kg	1.149 ± 0.086	33.1

(C) 복막하지방 축적 억제율

Dose	Peritoneal Fat weight (g)	Inhibition rate(%)
Normal control	0.157±0.010	-
Vehicle	0.711 ±0.045	-
Xenical	0.511 ±0.053	28.1
CLA	0.627 ±0.058	11.7
50mg/kg	0.577 ±0.059	18.8
100mg/kg	0.511 ±0.045	28.1
200mg/kg	0.538 ±0.034	24.3

(나) 곰솔 추출물 투여군에서의 혈구수치 및 생화학 수치분석

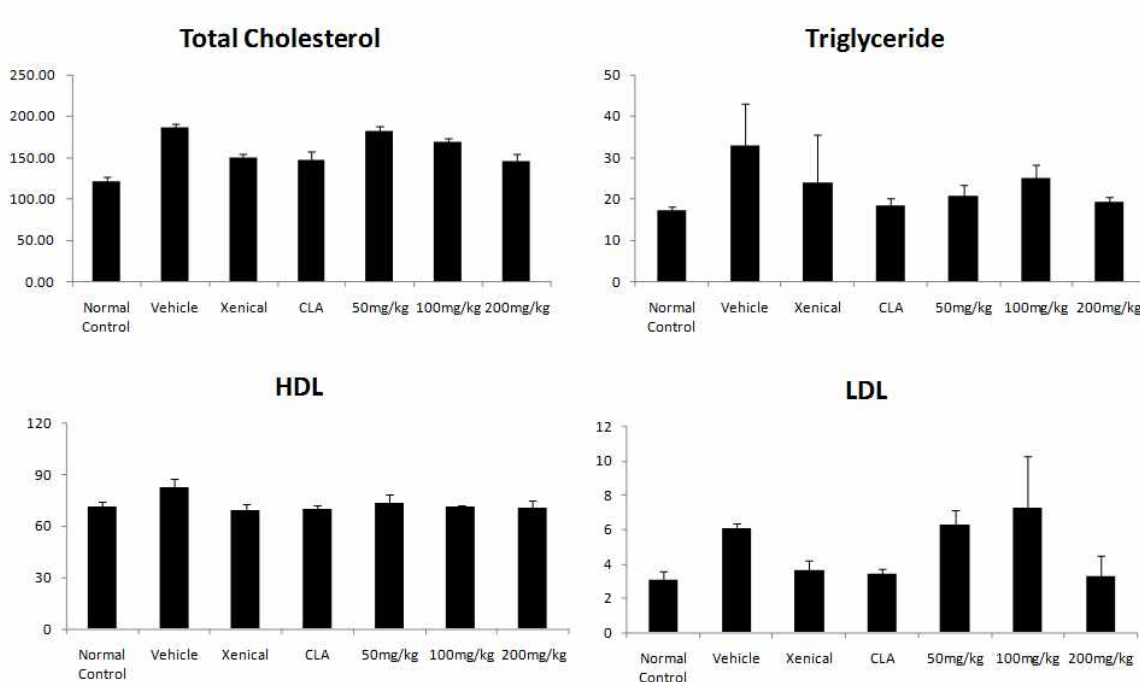
○ 동물을 하룻밤 절식시킨 후 이소플로란 마취하에 개복하여 복대정맥으로부터 채혈한 혈액을 항응고제인 EDTA가 들어있는 채혈병에 넣어 혈구자동계측장치(BECKMAN Coulter, USA)를 이용하여 WBC(white blood cell) count, RBC(red blood cell) count, Hemoglobin, Hematocrit, MCV(mean corpuscular volume), MCH(mean corpuscular hemoglobin), MCHC(mean corpuscular hemoglobin concentraion), Platelet을 측정하였음. 혈구분석 결과 모든 투여군의 검사항목에서 추출물 투여와 관련된 일관성 있는 변화가 관찰되지 않았음 (표 3-78). 혈액 생화학분석 결과, 고지혈증의 측정지표항목인 총콜레스테롤 분석결과 음성대조군이 186.00±5.35mg/dl인 반면 곰솔 추출물 200mg/kg 투여군에서 145.53±9.23mg/dl로 현저한 감소효과를 나타내었으며, 트리글리세리드 역시 음성대조군에 비해 감소하는 것을 나타냄. 혈액내 지질의 증가에 영향을 미치는 LDL 역시 음성대조군에서는 6.08±0.31mg/dl인 것에 비해 곰솔 추출물 200mg/kg 투여군에서 3.25±1.22mg/dl로 나타남.

<표 3-78. 고지방식으로 유도한 DIO I model에서 곰솔 추출물 투여 후 혈구분석 결과>

	WBC(x10 ³ /μL)	RBC(x10 ⁶ /μL)	Hemoglobin(g/dL)	Hematocrit(%)
Normal Control	2.1 ± 0.2	9.1 ± 0.1	13.3 ± 0.2	41.9 ± 0.6
Vehicle	2.6 ± 0.1	9.2 ± 0.2	13.1 ± 0.2	41.5 ± 0.7
Xenical	2.3 ± 0.3	8.1 ± 0.7	11.7 ± 1.0	39.5 ± 0.2
CLA	2.6 ± 0.3	9.1 ± 0.1	13.2 ± 0.1	41.2 ± 0.3
50mg/kg	3.2 ± 0.4	9.3 ± 0.3	13.2 ± 0.4	42.3 ± 1.2
100mg/kg	3.1 ± 0.4	9.2 ± 0.1	13.1 ± 0.2	41.6 ± 0.6
200mg/kg	2.4 ± 0.3	9.8 ± 0.1	13.9 ± 0.2	44.2 ± 0.7
	MCV(fL)	MCH(pg)	MCHC(g/dL)	Platelet(x10 ³ /μL)
Normal Control	46.0 ± 0.2	14.6 ± 0.0	31.7 ± 0.1	930.8 ± 134.2
Vehicle	45.0 ± 0.1	14.3 ± 0.0	31.7 ± 0.1	951.2 ± 143.7
Xenical	45.1 ± 0.2	14.4 ± 0.1	31.9 ± 0.1	877.7 ± 93.7
CLA	45.2 ± 0.1	14.4 ± 0.1	32.0 ± 0.1	841.6 ± 96.7
50mg/kg	45.4 ± 0.1	14.2 ± 0.1	31.3 ± 0.1	1008.7 ± 66.0
100mg/kg	45.2 ± 0.1	14.3 ± 0.0	31.5 ± 0.1	886.8 ± 80.7
200mg/kg	45.0 ± 0.1	14.1 ± 0.0	31.5 ± 0.1	1128.1 ± 64.2

<표 3-79. 고지방식으로 유도한 DIO I model에서 곰솔 추출물 투여 후 생화학분석 결과>

	Total cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
Normal Control	146.79 ± 1.11	17.23 ± 1.01	71.03 ± 3.02	3.09 ± 0.47
Vehicle	186.00 ± 5.35	32.76 ± 10.20	82.43 ± 4.86	6.08 ± 0.31
Xenical	149.71 ± 4.14	23.72 ± 11.93	68.76 ± 3.85	3.63 ± 0.61
CLA	147.52 ± 9.07	18.44 ± 1.79	70.02 ± 1.97	3.42 ± 0.30
50mg/kg	181.74 ± 5.95	20.54 ± 2.86	73.18 ± 4.82	6.28 ± 0.87
100mg/kg	168.22 ± 5.61	24.94 ± 3.30	71.17 ± 0.97	7.22 ± 3.03
200mg/kg	145.53 ± 9.23	19.22 ± 1.35	70.24 ± 4.37	3.25 ± 1.22



<그림 3-154. 고지방식으로 유발된 마우스의 비만 관련 지표에서의 곰솔 추출물 효과>

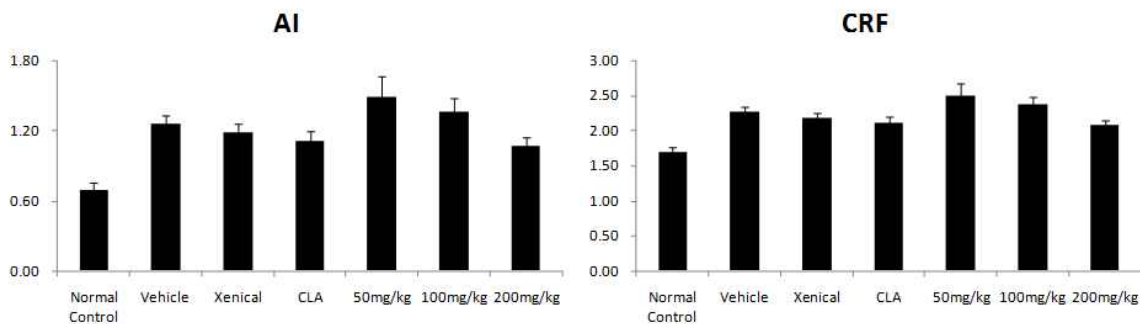
○ 비만으로 인한 심혈관계 질환의 위험도 판정에 이용되는 동맥경화지수(Atherogenic Index, AI)와 심혈관위험지수(Cardiac Risk Factor, CRF)를 다음의 식에 의하여 계산하여 분석하여 본 결과 음성대조군은 각각 1.26 ± 0.07 , 2.26 ± 0.07 인 반면 곰솔 추출물 200mg/kg투여군에서는 1.07 ± 0.07 , 2.07 ± 0.07 로 음성대조군에 비해 감소함(표 3-80, 그림 3-155).

- 동맥경화지수(Atherogenic Index, AI), 심혈관위험지수(Cardiac Risk Factor, CRF) 계산식

$$AI = \frac{\text{total cholesterol} - \text{HDL}}{\text{HDL}} \quad CRF = \frac{\text{total cholesterol}}{\text{HDL}}$$

<표 3-80. 고지방식으로 유발된 마우스에서의 동맥경화지수, 심혈관위험지수 분석결과>

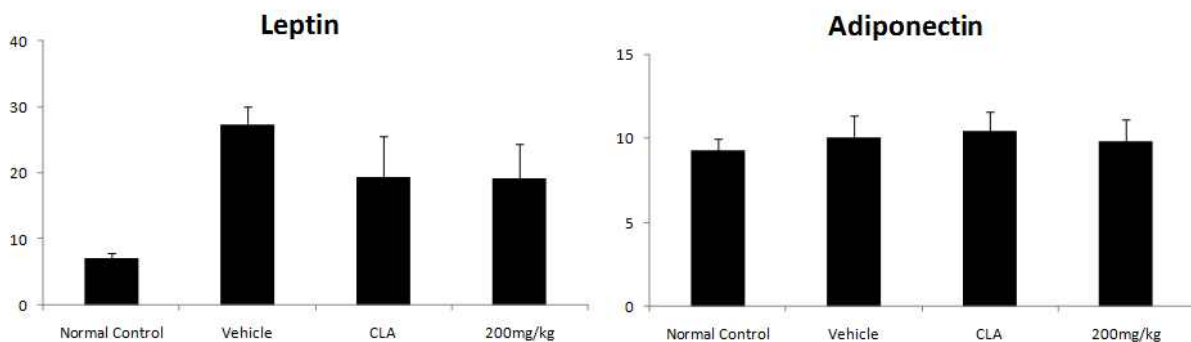
	AI (ratio)	CRF (ratio)
Normal control	0.69 ± 0.07	1.69 ± 0.07
Vehicle	1.26 ± 0.07	2.26 ± 0.07
Xenical	1.18 ± 0.07	2.18 ± 0.07
CLA	1.11 ± 0.09	2.11 ± 0.09
50 mg/kg	1.49 ± 0.17	2.49 ± 0.17
100 mg/kg	1.36 ± 0.11	2.36 ± 0.11
200mg/kg	1.07 ± 0.07	2.07 ± 0.07



<그림 3-155. 고지방식으로 유발된 마우스에서의 심혈관계 질환유발 억제 효능>

(다) 혈중 Leptin, Adiponectin 사이토카인 측정분석

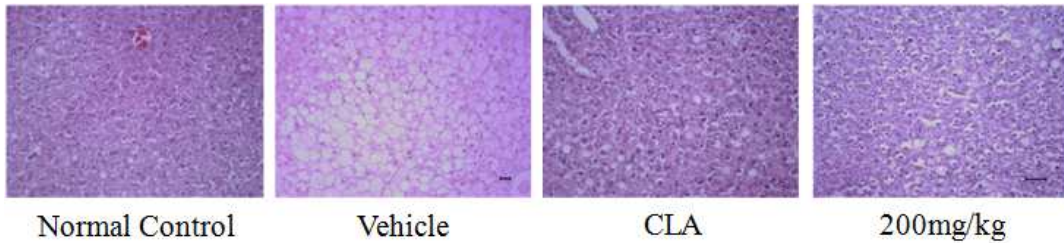
- 지방세포에서 분비되어 지방형성 및 식욕에 관여하는 호르몬인 leptin과 adiponectin의 혈중 농도를 측정 한 결과, vehicle 투여군에서 leptin과 adiponectin이 발현양이 각각 $27.44 \pm 2.55 \mu\text{g/ml}$, $10.07 \pm 1.29 \mu\text{g/ml}$, 양성대조군으로 사용된 CLA 투여군이 $19.35 \pm 6.23 \mu\text{g/ml}$, $10.43 \pm 1.17 \mu\text{g/ml}$, 곰솔 200mg/kg 투여군이 $19.23 \pm 5.16 \mu\text{g/ml}$, $9.82 \pm 1.25 \mu\text{g/ml}$ 로 발현양이 다소 감소되는 것으로 확인되었음 (그림 3-156).



<그림 3-156. 곰솔 투여군의 Leptin, Adiponectin 합성억제 효과>

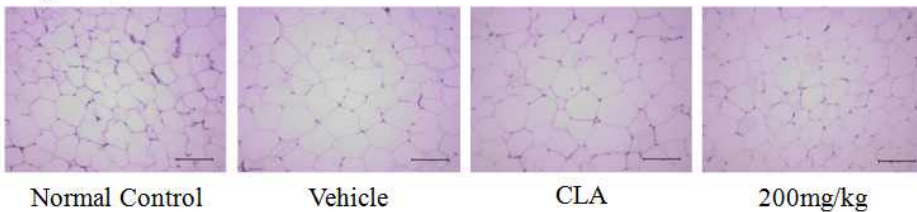
(라) 조직분석 결과 (간/지방 H&E 염색 후 현미경분석)

○ 희생시킨 동물의 간, 각 부위별 지방조직을 적출하여 10% formalin에 5일 동안 고정시킨 후 4 μ m 두께로 조직 슬라이드를 제작하였음. 조직 슬라이드는 xylene, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% ethanol의 단계로 탈파라핀과 함수과정을 거친 후 hematoxylin과 eosin으로 핵과 세포질을 염색하였고, permount를 이용하여 봉입한 후 현미경으로 관찰하였음. 음성대조군에서는 지방축적으로 인한 지방공포가 다수 관찰된 반면 곰솔 200mg/kg 투여군에서는 지방공포의 형성이 억제되는 것으로 나타남. 또한 각 부위의 지방세포 크기를 분석한 결과 음성대조군은 지방세포 면적이 복막하지방 72.9 \pm 11.0(X10³ mm²), 피하지방 44.9 \pm 15.1(X10³ mm²), 부고환지방 93.8 \pm 31.3(X10³ mm²)이었으며, 곰솔 추출물 200mg/kg 투여군의 복막하지방세포 크기는 74.7 \pm 13.7(X10³ mm²), 피하지방 24.4 \pm 5.2(X10³ mm²), 부고환지방 57.1 \pm 6.8(X10³ mm²)로 음성대조군에 비해 피하지방, 부고환지방의 세포크기가 감소하는 것을 확인함.

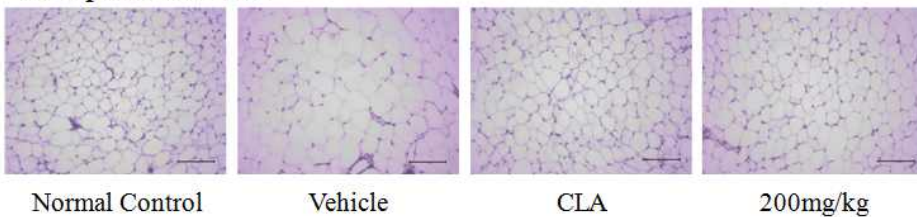


<그림 3-157. 고지방식으로 유발된 마우스의 간조직 H&E 염색 사진>

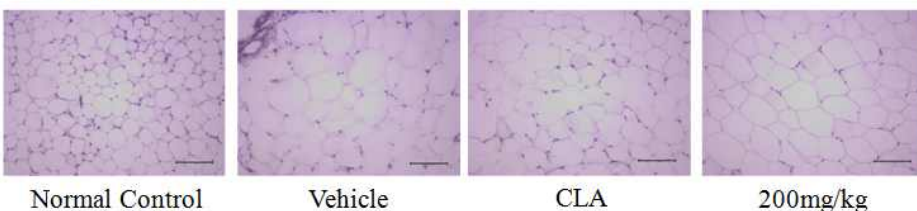
Epididymal Fat



Subcutaneous Fat



Peritoneal Fat



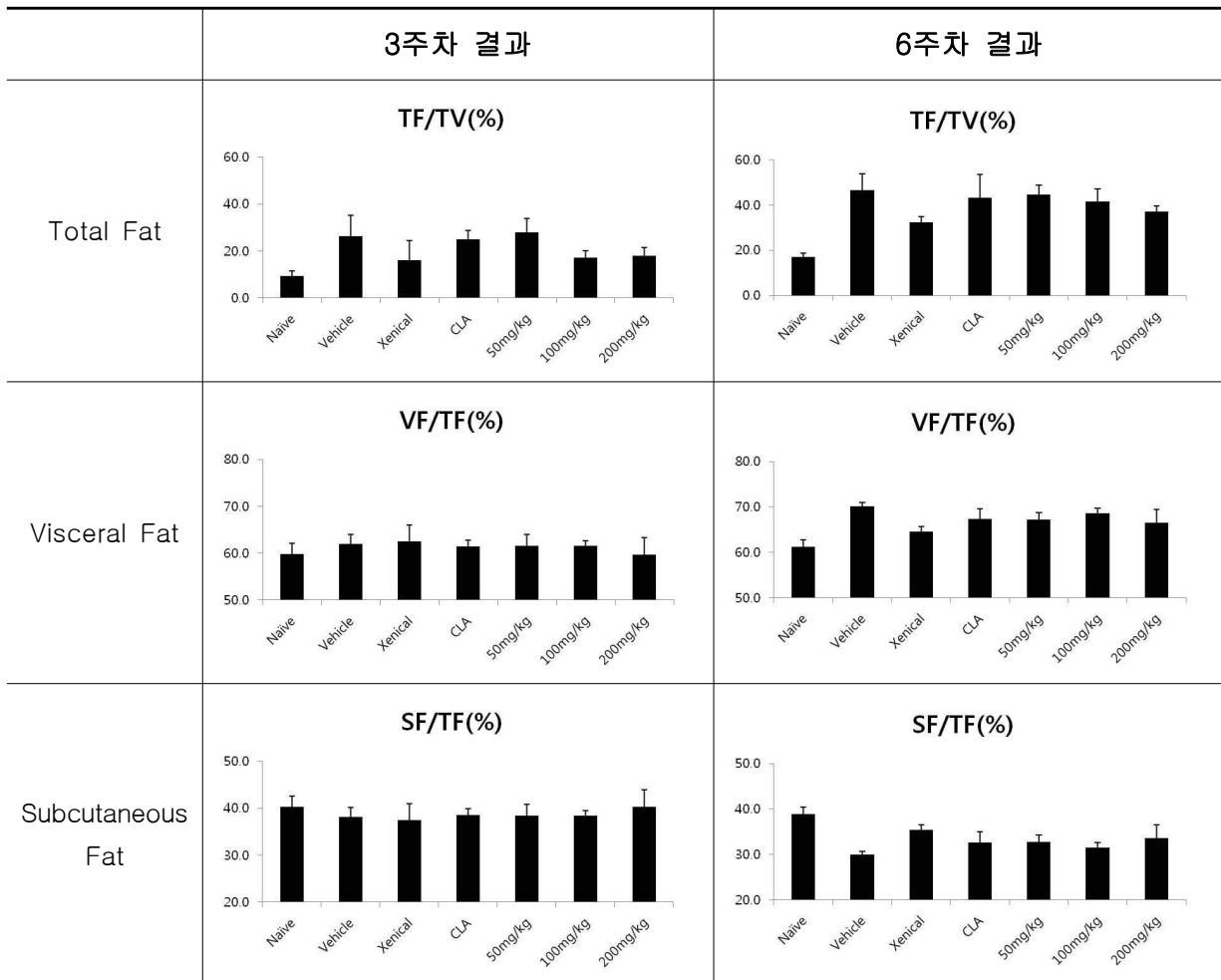
<그림 3-158. 고지방식으로 유발된 마우스의 부고환지방, 피하지방, 복막하지방 H&E 염색 사진>

<표 3-81. 고지방식으로 유도한 DIO I model에서 곰솔 투여군의 지방세포면적 분석 결과>

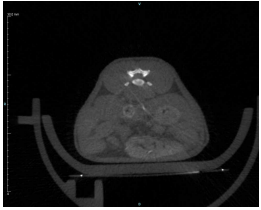
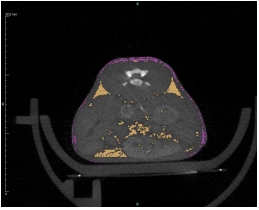
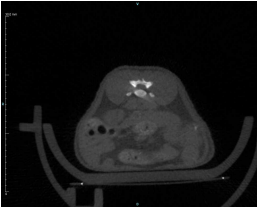
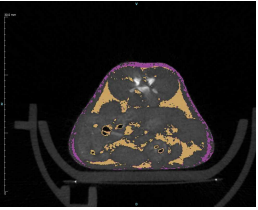
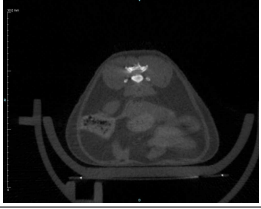
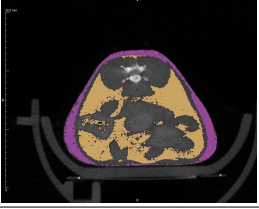

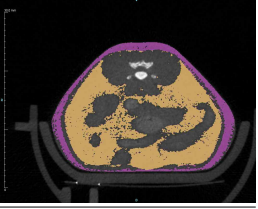

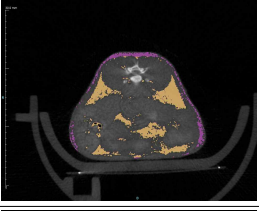

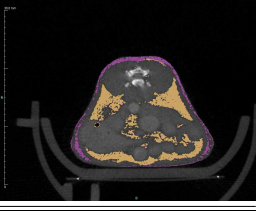

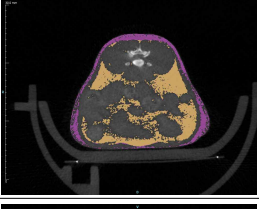


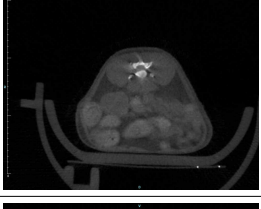
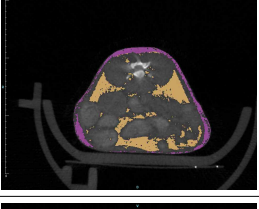


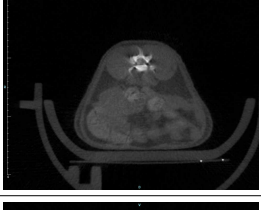
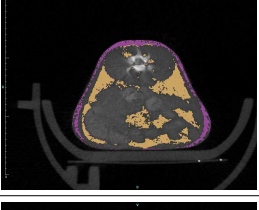
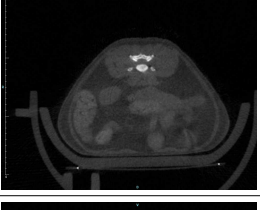
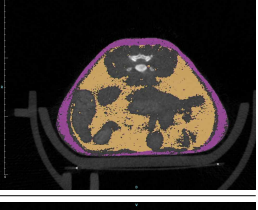
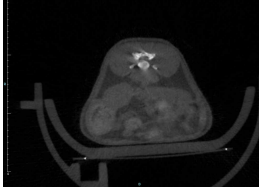
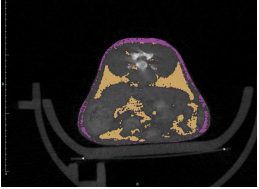
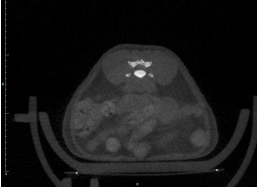
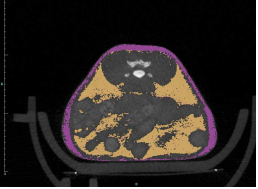
	Epididymal Fat (X10 ³ mm ²)	Subqutaneous Fat (X10 ³ mm ²)	Pefitoneal Fat (X10 ³ mm ²)
Normal Control	50.7 ± 8.7	35.1 ± 10.8	46.0 ± 21.1
Vehicle	72.9 ± 11.0	44.9 ± 15.1	93.8 ± 31.3
CLA	61.5 ± 3.7	15.0 ± 3.7	62.3 ± 18.1
200mg/kg	74.7 ± 13.7	24.4 ± 5.2	57.1 ± 6.8

(마) DIO I 비만유도 마우스 모델에서 micro-CT 측정

○ 비만 유도 마우스 모델에서 micro-CT를 통해 마우스의 복부 부위를 스캔하여, S1 ~ S6 사이의 복부 부위를 관심영역으로 지정 후 지방량을 측정한 결과 대조군에 비해 처리군에서 지방량이 억제됨을 확인할 수 있었음. 특히 곰솔 200mg/kg 용량에서의 총지방량(TF/TV)이 37.1%로 양성대조군의 하나인 CLA 처리군의 총지방량(TF/TV) 46.5% 보다 지방량 억제효과가 우수함을 확인하였음.



<그림 3-159. 비만유도 마우스 Micro CT Image 복부지방량 분석결과 (6주차)>

	3주차 결과		6주차 결과	
	CT image	지방량	CT image	지방량
Normal control				
Vehicle				
Xenical				
CLA				
50 mg/kg				
100 mg/kg				
200 mg/kg				

<그림 3-160. 비만유도 마우스 Micro-CT Image 결과 (6주차)>

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발의 목표 및 달성도

1. 연차별 연구개발 목표 및 달성도

구분	연구개발목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차년도	◦ 경단구슬모자반과 곰솔 추출물의 분획 및 분리	100	- 지표, 기능성분 분리를 위한 경단구슬모자반과 곰솔 추출물의 분획 및 분리
	◦ 경단구슬모자반 추출물의 항비만 기능 성분 다량 분리 및 지표물질 규명	100	- 항비만 screening 결과 기능 활성을 나타내는 물질들의 분리 및 구조규명 - 최적 추출조건에 의해 얻어진 경단구슬모자반과 곰솔의 지표물질 규명
	◦ 세포내 항비만 screening	100	- 경단구슬모자반과 곰솔 추출물의 항비만 <i>in vitro</i> 활성 시험 (항비만 활성을 나타내는 물질들의 세포내 Oil Red O assay)
	◦ 동물내 안전한 농도 설정을 위한 MTD (Maximum tolerated dose)평가	100	- 최적 조건에서 체지방 감소 활성을 나타내는 물질을 가장 많이 함유한 경단구슬모자반 엑스의 동물내 간독성 연구
	◦ 항비만 유효성 <i>in vivo</i> 평가	100	- 경단구슬모자반 추출물을 이용 동물모델에서의 체지방 감소 효능 평가 (DIO I model)
	◦ 경단구슬모자반의 pilot 단위의 원료 확보를 위한 방안 모색	100	- 경단구슬모자반 원료 수급에 관한 자료조사 - 계약수매 등 지속공급 가능한 대량확보 방안 모색
	◦ 최적 추출조건에 의하여 얻어진 경단구슬모자반의 semi-pilot scale 추출법 확립	100	- 경단구슬모자반의 제조공정에 따른 표준화 공정작업 완료 - Semi-pilot scale 추출법 확립
	◦ GMP 공정하에 식품원료 제조 공정 확립	100	- GMP-pilot scale 주정추출공정 확립
2차년도	◦ 경단구슬모자반 원료 규격 표준화 및 원료의 validation	100	- 경단구슬모자반 추출물의 성분 분리정제를 통한 유효 및 지표성분 발굴 - 성분분석을 통한 최적 분석조건 및 시험법 확립 - 최적 엑스의 시험법 validation 수행
	◦ 항비만 유효성 <i>in vivo</i> 평가	100	- 경단구슬모자반 추출물을 이용한 동물모델을 통한 체지방 감소 효능 평가 (DIO II 동물모델 실험)
	◦ 세포내 및 조직내 작용기전 연구	100	- 경단구슬모자반 추출물의 유전자 및 단백질 수준에서의 작용기전 연구 - 추출물에서 분리된 유효물질에 대한 세포내 항비만 효능 측정 - 경단구슬모자반 추출물과 지표물질인 Fucosterol의 세포내 항비만 활성의 비교실험 진행 - 곰솔 추출물을 통해 항비만 효능이 가장 우수한 에탄올 농도 설정
	◦ 안전성 평가	100	- GLP 기관에 연구 의뢰를 통한 경단구슬모자반 최

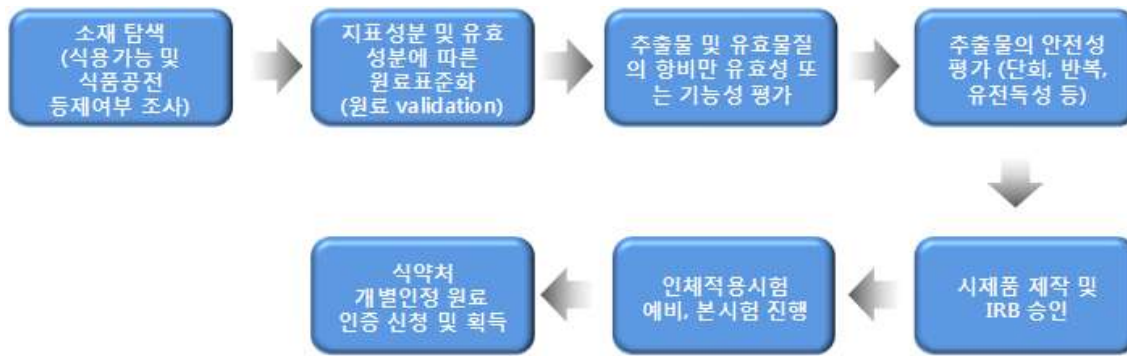
			적액스의 안전성 평가 진행 : 설치류의 단회투여 독성 시험
	◦ 제제연구 시제품 제작	100	- 참여기업을 통한 인체적용시험용 시제품 제작에 따른 제제, 제형
	◦ 곰솔의 pilot 단위의 원료확보를 위한 방안모색 ◦ 곰솔의 채집시기별, 지역별, 용매농도별 추출공정 확립	100	- 항비만 활성결과에 따른 최적추출 용매조건 확립
	◦ 최적 추출조건에 의하여 얻어진 곰솔의 semi-pilot scale 추출법 확립	100	- 추출수율 및 지표성분 함량 변화 비교분석
	◦ 건강기능식품 기능성원료 scale up	100	- Pilot scale 추출공정 및 제조공법 확립(GMP) - Semi-pilot scale 추출을 원료표준화 조건 기준 규격설정 시 3LOT 이상 실시하여 지표성분 함량 및 추출수율, 영양성분, 유해성분 등의 분석결과가 일정함을 확인하고 이를 식품원료 제조공정과 기준규격으로 설정
3차년도	◦ 기능성 인체적용시험	100	- 체지방 감소 관련 기능성 인체적용시험 실시
	◦ 곰솔 원료 규격 표준화 및 원료의 validation	100	- 곰솔 추출물의 성분 분리정제를 통한 유효 및 지표성분 발굴 - 성분분석을 통한 최적 분석조건 및 시험법 확립 - 최적 액스의 시험법 validation 수행
	◦ 세포내 유효성 평가	100	- 곰솔 추출물 속 유효물질 규명을 통한 항비만 세포내 유효성 평가
	◦ 항비만 유효성 <i>in vivo</i> 평가	100	- 곰솔 추출물을 이용한 동물모델을 통한 체지방 감소 효능 평가 (DIO I 동물 모델 실험)
	◦ 안전성 평가	100	- 곰솔 추출물의 간이 독성을 평가하기 위한 MTD 평가
	◦ 개별인정 신청 자료 준비	100	- 경단구슬모자반 추출물 원료의 개별인정형 신청 절차 진행중
	◦ 특허 출원 보완 및 등록 ◦ 논문 게재	70	- 경단구슬모자반 추출물을 체지방 개선 관련 특허 출원 4건 출원 (1차년도 1건, 2차년도 1건, 3차년도 2건) - 특허 등록 2건 완료 - 국내논문 게재 1편, SCI급 게재 1편 (1차년도 1편 게재, 3차년도 1편 게재, 7편 작성 투고중)

2. 정량적 연구성과 목표 및 달성도

구분	목표	달성도	비고
특허출원	3	4	초과 달성
특허등록	1	2	초과 달성
논문 SCI	6	1	5편 작성 및 투고 중
논문 비SCI	3	1	2편 작성 및 투고 중

제 2 절 관련분야 기술 발전 기여도

○ 본 발명은 체지방 감소를 위한 건강기능성식품에 관한 것으로 기능제품을 개발하는 프로세스에 따라 원료의 표준화를 기반으로 표준화된 원료의 기능성 및 유효성과 안전성을 평가한 후 인체적용시험이 진행되어 식약처 인증신청 및 획득단계의 R&D과정을 모두 완료하였음. 아래 그림 4-1. 참조



<그림 4-1. 체중감소에 영향을 미치는 개별인정형 건강기능식품 개발단계 모식도>

○ 위의 개발단계 모식도에 충실한 개발 결과로 인증획득은 물론 향후 개발제품의 객관적인 유효성 연구결과가 제공 가능하여 관련 건강기능식품분야의 과학적인 제품화 개발에 모범적인 개발과정의 선례를 제공가능. 국제적으로 인정받는 연구결과 발표로 국내 원료의 우수성을 국외에도 알릴 수 있음.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 실용화 산업화 계획

○ 본 발명은 체지방 감소를 위한 건강기능성식품에 관한 것으로 제주도에서 자생하는 곱솔과 경단구슬모자반 추출물을 이용하여 그 원료내 체지방 감소 활성 성분을 다량 함유한 표준화된 최적추출공법으로 곱솔과 경단구슬모자반의 엑스를 개발하여 이 원료를 통해 식품의약품안전처의 허가와 인증을 받아 우수한 제품으로 개발하고자 하는 목표로 진행되었음. 개발 원료로 제주도에서 자생하는 곱솔과 경단구슬모자반을 이용하였기에 그 지역에서 자생하는 농작물의 생산량 증대 효과와 더불어 국내 품종의 우수성을 국제적으로도 알리고자 하였으며 더 나아가 세계시장 진출을 통해 국가경쟁력 확보에 따른 브랜드 창출 및 신기술 보유에 의한 부가가치 창출에 도움을 줄 수 있는 고부가가치 식품개발을 이루고자 함.

○ 본 사업에서 도출된 우수기술은 참여기업인 (주)테라젠이텍스에 기술이전 되었으며, 참여기업은 본 기술을 활용하여 향후 본 인체적용시험을 진행한 후 식약처에 개별인정형 건강기능식품 원료 인정을 진행하여 제품을 출시할 계획을 가지고 있음. 체지방 감소를 위한 건강기능성 식품으로 판매가 이루어질 경우 매년 30억 이상의 제품 판매 매출을 기록할 수 있음 (현재 참여기업에서 판매하고 있는 건강기능식품인 관절건강개선제의 판매액과 비교해서 산출 가능 액수). 또한 (주)테라젠이텍스는 의약품 GMP와 기능식품 GMP시설을 모두 갖추고 있으며, 판매망은 기존에 판매하고 있는 건강기능식품인 관절건강개선제의 판매망과 약국 체인을 이용하여 유통경로를 확보한 상태임.

○ 또한 제품출시에 따라 본 원료를 이용하여 다양한 제제, 제형연구를 통해 가공적성에 대한 연구가 진행되어 유아용, 청소년, 성인용 제형 등의 타깃 연령별 선호도를 고려한 응용 제품이 출시된다면 매출에 도움이 될 것으로 전망함.

○ 상업화에 필요한 원료를 산출해볼 때 600톤 이상의 원료를 필요로 하므로 현재 제주도 우도, 추자도지방외 전지역에서 자생하는 경단구슬모자반의 경우 최대 100톤의 생산량 밖에 집계되지 않아 그 지역외의 타 국내지역을 통해 생산량을 늘려 제품화를 진행하는 방법도 모색 중에 있음. 향후 원료확보를 위해 재배 지역을 넓혀 남해안의 따뜻한 지역을 중심으로 목포와 진도 해안주변을 모색할 예정이며, 이곳 생산 모자반 원료와 경단구슬모자반 추출물의 성분 패턴 분석과 유효성 부분을 확인 후 제품화 가능성을 판단한다면 모자반 재배를 생계 수단으로 생활하는 수산업 종사자들에게 큰 소득증대가 있을 것으로 전망함.

○ 현재 자생하는 모자반의 가격은 건물 1kg당 20,000원에 거래가 되고 있으나, 대량재배가 가능할 경우 1kg당 5,000원 이하의 단가로 조정이 가능하다고 조사됨. 따라서 현재 제주 지역에서 100톤 정도 자생하는 모자반을 600톤 이상 수급하기 위해서 대량 재배를 진행하고 이를 통해 원료 단가를 낮추어 생산량을 극대화시킬 수 있음. 현재 제주에서 생산되는 비슷한 해조류인 감태의 경우, 대량생산에 성공하여 건물 1kg당 1,000원~2,000원에 판매되고 있음.

○ 기술실시 및 기술료

- 본 과제의 참여기업으로 3년간 참여기업 부담금으로 3,000만원을 (연간 1,000만원씩) 지원

하여 과제에 참여한 (주)테라젠이텍스에 본 연구의 성과인 유효물질 특허 ‘푸코산틴 유도체를 이용한 항비만용 조성물, 특허번호 10-2013-0087671’의 특허 전용실시권을 기술이전하였음 (2015년 1월 13일).

- 또한 과제 종료 후, 성과활용기간동안 식약처 인증 개별인정형 원료 허가시 정액기술료 2,000만원을 받는 조건으로 협약 실시.

제 2 절 교육, 지도, 홍보 등 기술확산 계획

○ 교육 및 지도는 현재 본연구팀에서 진행하고 있는 천연물신약 및 개별인정형 건강기능식품 개발에 대한 기술지도 프로그램을 활용하여 지속적으로 진행할 예정임.

* 참고 : 개별인정형 건식 개발을 위한 유효성 평가 R&D 과정의 전문적 컨설팅 및 기술지도를 연간 100건이상 지원함

○ 언론홍보는 과제 종료 후 2015년 1월 13일 참여기업인 (주)테라젠이텍스에 특허 전용실시권을 기술이전함에 따라 TV 및 라디오, 일간지 등 17곳에 기술이전 및 경단구슬모자반의 체지방 감소 효능 입증에 관한 홍보를 실시하였음.

○ 언론홍보 : TV 1건, 라디오 1건, 신문 및 잡지 등 일간지 15건

1. 지방 TV (경기GTV) 제주서 자란 모자반으로 체지방 감소 2015.1.16
2. 지방 라디오 (경인방송) 경기과기원, 체지방 감소 유효물질 기술이전 2015.1.13
3. 지방 일간지 (경기일보) 경기과기원, 중기에 체지방 감소 유효물질 기술이전 2015.1.13
4. 중앙 일간지 (뉴시스) 경기과기원, 모자반 이용 체지방 감소 유효물질 기술이전 2015.1.13
5. 중앙 전문지 (머니투데이) 경기과기원, 체지방 감소 유효물질 민간에 기술이전 2015.1.13
6. 지방일간지 (뉴스1코리아) 경기과기원, 중소기업에 ‘체지방감소 건강식품’ 기술이전 2015.1.13
7. 중앙전문지 (서울경제신문) 경기과기원 체지방 감소 유효물질 기술이전 외 2015.1.13
8. 지방전문지 (데일리팝) 모자반 추출물로 체지방 감소 건식 개발 추진 2015.1.13
9. 중앙전문지 (아주경제) 경기과기원, 체지방 감소 유효물질 기술이전 2015.1.13
10. 중앙전문지 (파이낸셜뉴스) 경기과기원, 체지방 감소 유효물질 기술이전 2015.1.13
11. 중앙전문지 (일요신문) 체지방 감소 유효물질 기술이전 2015.1.13
12. 지방전문지 (일간경기) 경기도과기원, 체지방 감소 유효물질 기술이전 2015.1.13
13. 지방전문지(신아일보) 경기과기원, 체지방 감소 유효물질 기술이전 2015.1.13
14. 인터넷 뉴스 (약업닷컴) 테라젠이텍스, 모자반서 분리 체지방 감소 물질 기술이전 2015.1.13
15. 인터넷 뉴스 (이뉴스투데이) 경기과기원, 체지방 감소 유효물질 기술이전 2015.1.13
16. 중앙일간지 (중앙일보) 경기과기원·(주)테라젠이텍스, 기술이전 협약식 체결 2015.1.13
17. 지방일간지(국제뉴스) 경기과기원, 체지방 감소 유효물질 기술이전 2015.1.13

제 3 절 특허, 논문 등 지식재산권 확보계획

○ 기존 특허는 녹차나 가시오가피 추출물을 사용해 항비만 효능 연구 분야에 치중되어 있고 원료표준화가 되어 있지 않은 원료로 식약처 허가를 받는 연구 자료로 활용이 어렵거나 여러 추출물의 혼합형태의 엑스를 이용하여 효능평가를 수행한 결과를 특허출원한 경우로 그 연구 결과가 기본적인 실험에만 국한 적이므로 그 효능이 인체 내 세포와 동물내의 다양한 작용 기전으로 밝혀져 있지 않음. 본 연구과제에서 앞선 특허들에서 보이는 문제점들을 파악하여 개별 인정형 건강기능식품을 개발하는 과정에 충실하여 연구계획을 설정하여 진행하였고, 그 결과 경단구슬모자반과 곰솔추출물의 최적화 및 표준화된 엑스를 개발하고 그 속에 존재하는 지표와 유효성분을 분리하여 지방세포에서 지방 분화억제 및 다양한 대사증후군 현상을 억제하는 활성을 세포내 반응기전 연구를 통해 규명하였음. 이를 기반으로 최적엑스 및 유효물질에 대한 특허 4건을 확보하고 이중 2건의 특허가 등록이 완료된 상태임. 출원된 특허 중 경단구슬모자반 유효물질 관련 특허는 참여기업인 (주)테라젠이텍스에 식약처 개별인정형 원료 허가시 2,000만원의 정액기술료를 받는 조건으로 기술이전 하였음. 논문의 경우, 현재 2편의 논문에 게재된 상태이고 5편 이상의 논문을 작성 및 투고 중에 있으며, 개별인정을 받기위한 논문자료로 활용될 계획임. 성과 활용 기간내에 차근차근히 진행하여 반드시 논문 성과를 달성할 계획임.

1. 특허

구분	특허명	출원일/ 등록일	출원번호/ 등록번호	발명인	출원인
특허 출원	경단구슬모자반 추출물을 이용한 항비만제(고지혈증 개선용) 조성물	2012.01.12	10-2012-0003944	안은경 외 9인	(재)경기과학기술진흥원 외 2
특허 출원	푸코산틴 유도체를 이용한 항비만용 조성물	2013.07.24	10-2013-0087671	안은경 외 5인	(재)경기과학기술진흥원 외 1
특허 출원	경단구슬모자반 추출물을 이용한 항비만제(지방간 개선용) 조성물	2014.02.14	10-2014-0017475	안은경 외 9인	(재)경기과학기술진흥원 외 2
특허 출원	경단구슬모자반 추출물을 이용한 항비만제 조성물	2014.02.14	10-2017-0017478	안은경 외 9인	(재)경기과학기술진흥원 외 2
특허 등록	경단구슬모자반 추출물을 이용한 항비만제(지방간 개선용) 조성물	2015.01.20	10-1486312-0000	안은경 외 9인	(재)경기과학기술진흥원 외 2
특허 등록	경단구슬모자반 추출물을 이용한 항비만제(고지혈증 개선용) 조성물	2015.01.20	10-1486317-0000	안은경 외 9인	(재)경기과학기술진흥원 외 2

2. 논문

가. 출판 및 게재 예정(심사중)

게재연도	논문명	저자			학술지명	Vol.(No.)	국내외 구분	SCI구분
		주저자	교신저자	공동저자				
2012	3T3-L1 지방전구세포에서 용아초에틸아세테이트 추출물의 항비만 효과	이정아	오좌섭	안은경, 홍성수	한국식품영양과학회지	41(2)	국내	비SCI
2014	Neolignan Inhibitors of Antigen-Induced Degranulation in RBL-2H3 Cells from the needles of <i>Pinus thunbergii</i>	Seong Su Hong	Joa Sub Oh	Wonsik Jeong, Jin Kyu Kim, Jin Gwan Kwon, Jae Yeon Lee, Eun-Kyung Ahn, Junho Oh, Dong-Wan Seo	Fitoterapia	99	국외	SCIE
2014	Chemical Constituents from the <i>Sargassum muticum</i> and Their Inhibitory Effects on Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells	Seong Su Hong	Joa Sub Oh	Changon Seo, Yun_Hyeok Choi, Jin Kyu Kim, Jin Gwan Kwon, Jung A Lee, Eun-Kyung Ahn, Dong-Wan Seo	Bulletin of the Korean Chemical Society	submission 예정	국내	SCI
2015	Ethanol extract of <i>Sargassum muticum</i> (Yendo) Fensholt	Eun-Kyung Ahn	Joa Sub Oh	Jung A Lee, Hye Jin Ko, Jea Yeon Lee,	Journal of the Korean Society for Applied Biological	submission 예정	국내	SCIE

	inhibits adipogenesis			Han-Jik Ko	Chemistry			
2015	Ethanol extract of <i>Pinus thunbergii</i> inhibits adipogenesis	Eun-Kyung Ahn	Joa Sub Oh	Jung A Lee	Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry	submission 예정	국내	SCIE
2015	Anti-obesity effect of ethanol extract of <i>Pinus thunbergii</i> in vivo	Eun-Kyung Ahn	Joa Sub Oh	Jung A Lee, Hye Jin Ko	Phototherapy research	submission 예정	국외	SCI
2015	Anti-obesity effect of ethanol extract of <i>Sargassum muticum</i> (Yendo) Fensholt in vivo	Eun-Kyung Ahn	Joa Sub Oh	Jung A Lee, Hye Jin Ko	Phototherapy research	submission 예정	국외	SCI
2015	경단구슬모자반이 인체에 미치는 영향	-	-	-	한국식품영양학회	submission 예정	국내	비SCI
2015	3T3-L1 지방전구세포에서 곰솔 에틸아세테이트 추출물의 항비만 효과	이정아	오좌섭	안은경	응용생명화학회지	submission 예정	국내	비SCI

나. 학술대회 발표

- (1) Inhibitory Effect of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt on Adipogenesis in 3T3-L1 Cells (2012 immunology)
- (2) Inhibitors of adipogenesis in 3T3-L1 cells isolated from the aerial parts of *Agrimonia pilosa* (2012 대한약학회)
- (3) Inhibitors of LPS-induced nitric oxide production in macrophage RAW264.7 cells from *Sargassum muticum* (2012 대한약학회)
- (4) Anti-obesity effect of ethanol extract of *sargassum muticum*(Yendo) Fensholt in vitro and in vivo (2013 한국실험동물학회)

Saringosterol isolated from *Sargassum muticum* extract inhibits adipogenesis in 3T3-L1 cells

Jung A Lee¹, Eun-Kyung Ahn¹, Seong Su Hong¹, Joa Sub Oh^{1,2*}

¹Natural Products Research Institute, Gyeonggi Institute of Science & Technology Promotion, 147 Gwanggo-ro, Youngtong-gu, Suwon-si Gyeonggi-do 443-766, Republic of Korea
²College of Pharmacy, Dankook University, 119, Dansoo-ro, Dongnam-gu, Cheonan-si, 330-714, Republic of Korea

Abstract

In this study, we investigated the saringosterol isolated from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt inhibits adipocyte differentiation and expression of adipogenic marker genes, such as PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ), C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein α), adiponectin, adipocyte fatty acid-binding protein 2, Resistin, and FFA in 3T3-L1 cells. We demonstrated that saringosterol induced a significant decrease in lipid accumulation and expression of adipogenic marker genes in a dose-dependent manner. In addition, saringosterol suppressed expression of PPAR γ , C/EBP α and adiponectin protein levels. Our findings provide that saringosterol inhibits adipocyte differentiation through downregulation of various adipogenic markers by blocking PPAR γ and C/EBP α expression.

Introduction

Sargassum muticum (Yendo) Fensholt is widely distributed on the seashore of eastern and southern Korea. The extract has been reported to have biological activities, including antitumor, antibacterial activity and anti-inflammatory activity. Saringosterol, a phytosterol of marine alga *Sargassum muticum*, has been reported to possess antiproliferative activity, whereas the β -CD3E β agonist and activator against *Allochroococcus anophagefferens*. Obesity is one of the present intractable factors involved in the development of metabolic syndrome. Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) and CCAAT/enhancer-binding protein α (C/EBP α) have been known to play a key role in the regulation of adipogenic cell maintenance in a number of adipose cell lines and in preadipocytes. PPAR γ and C/EBP α are expressed prior to the expression of most adipogenic genes and regulate expression of genes involved in creating and maintaining the adipocyte phenotype, including adipic acid (AD) (SREBP). In this study, we examined the effect of *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt on *in vitro* preadipocyte differentiation with 3T3-L1 cell line and high fat diet related mouse model.

Results

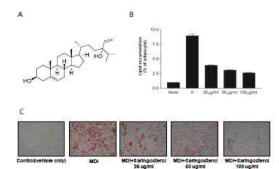
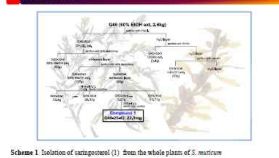


Fig. 1. Effect of Saringosterol on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. (A) Structure of Saringosterol isolated from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. (B) Triglyceride content was quantified by measuring absorbance. (C) Lipid droplets were stained by Oil Red O staining.

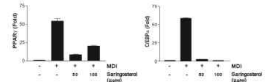


Fig. 2. Effect of Saringosterol on gene expression of PPAR γ and C/EBP α . Post-confluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or in the presence of Saringosterol for 8 days. PPAR γ and C/EBP α mRNA expression were estimated by a quantitative real-time PCR.

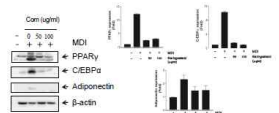


Fig. 3. Effect of Saringosterol on expression of PPAR γ , C/EBP α and adiponectin at protein level in 3T3-L1 cells. Post-confluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or in the presence of Saringosterol for 8 days. PPAR γ , C/EBP α and adiponectin protein expression were analyzed by western blotting. Cells were treated with 10 μ g/ml and 100 μ g/ml of Saringosterol.

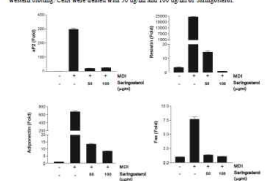


Fig. 4. Effect of Saringosterol on expression of adipogenic factors in 3T3-L1 cells. Post-confluent 3T3-L1 cells were differentiated in the absence or in the presence of Saringosterol for 8 days. PPAR γ , C/EBP α and adiponectin protein expression were analyzed by western blotting. Cells were treated with 10 μ g/ml and 100 μ g/ml of Saringosterol.

Conclusion

We found compound 1 isolated from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt and it is identified as saringosterol. We investigated the effect of Saringosterol isolated from *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt on adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. Our results showed that saringosterol had potent anti-adipogenic activity and that treatment with saringosterol resulted in decreased levels of PPAR γ , C/EBP α , adiponectin, adipic acid and FFA in 3T3-L1 cells. These findings suggest that saringosterol can be developed as an effective anti-obesity agent by inhibition of adipocyte differentiation mediated through downregulation of adipocyte-specific genes.

Acknowledgement

This research was supported by High Value-added Food Technology Development Program (11102-001-00000), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea.

gstep Gyeonggi Natural Products Research Institute

Inhibitory Effects of Fucoxanthinoids and Sterols from an Edible Brown Alga *Sargassum muticum* on Adipocyte Differentiation in 3T3-L1 Cells

Eun-Kyung Ahn¹, Ju Young Shin¹, Jung A Lee¹, Seong Su Hong¹ and Oh Joa Sub^{1,2*}

¹Natural Products Research Institute, Gyeonggi Institute of Science & Technology Promotion, Suwon 443-270, Korea.
²College of Pharmacy, Dankook University, Cheonan 330-714, Korea.

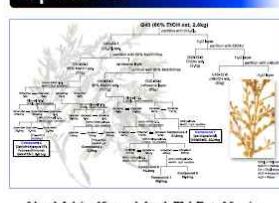
Abstract

In the course of screening anti-adipogenic activity of natural products employing the preadipocyte cell line, 3T3-L1 as an *in vitro* assay system, the OX β 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 830, 831, 832, 833, 834, 835, 836, 837, 838, 839, 840, 841, 842, 843, 844, 845, 846, 847, 848, 849, 850, 851, 852, 853, 854, 855, 856, 857, 858, 859, 860, 861, 862, 863, 864, 865, 866, 867, 868, 869, 870, 871, 872, 873, 874, 875, 876, 877, 878, 879, 880, 881, 882, 883, 884, 885, 886, 887, 888, 889, 890, 891, 892, 893, 894, 895, 896, 897, 898, 899, 900, 901, 902, 903, 904, 905, 906, 907, 908, 909, 910, 911, 912, 913, 914, 915, 916, 917, 918, 919, 920, 921, 922, 923, 924, 925, 926, 927, 928, 929, 930, 931, 932, 933, 934, 935, 936, 937, 938, 939, 940, 941, 942, 943, 944, 945, 946, 947, 948, 949, 950, 951, 952, 953, 954, 955, 956, 957, 958, 959, 960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969, 970, 971, 972, 973, 974, 975, 976, 977, 978, 979, 980, 981, 982, 983, 984, 985, 986, 987, 988, 989, 990, 991, 992, 993, 994, 995, 996, 997, 998, 999, 1000.

Introduction

Sargassum muticum is widely distributed on the seashore of eastern and southern Korea. Its extract has been reported to have biological activities, including antitumor, antibacterial activity and anti-inflammatory activity. On the other hand, previous studies on the phytochemical composition of *S. muticum* have led to the isolation of only a few compounds. As part of our research program for the discovery of plant-derived inhibitors of the accumulation, we found that the 40% ethanol extract of *S. muticum* inhibited adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. This paper deals with the isolation of chemical constituents from *S. muticum* in order to identify the inhibitory effects of the isolated compounds, on using an preadipocyte differentiation with 3T3-L1 cell line.

Experimental



Scheme 1. Isolation of Compounds from the Whole Plant of *S. muticum*

Results

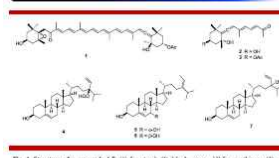


Fig. 1. Structure of compounds 1-7: (1) Saringosterol, (2) 14-hydroxy-11-fucocholestanol, (3) 11-fucocholestanol, (4) 24-hydroxy-11-fucocholestanol, (5) 14-hydroxy-11-fucocholestanol, (6) 11-fucocholestanol, (7) 14-hydroxy-11-fucocholestanol.

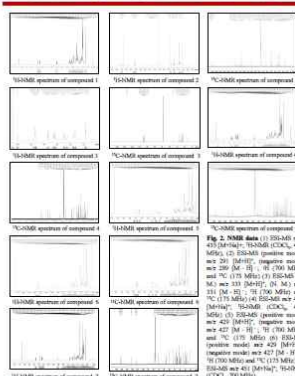


Fig. 2. HPLC chromatograms of compounds 1-7. (1) Saringosterol, (2) 14-hydroxy-11-fucocholestanol, (3) 11-fucocholestanol, (4) 24-hydroxy-11-fucocholestanol, (5) 14-hydroxy-11-fucocholestanol, (6) 11-fucocholestanol, (7) 14-hydroxy-11-fucocholestanol.

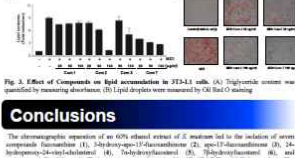


Fig. 3. Effect of Compounds on lipid accumulation in 3T3-L1 cells. (A) Triglyceride content was quantified by measuring absorbance. (B) Lipid droplets were stained by Oil Red O staining.

Conclusions

The chromatographic separation of a 40% ethanol extract of *S. muticum* led to the isolation of seven compounds: (1) saringosterol, (2) 14-hydroxy-11-fucocholestanol, (3) 11-fucocholestanol, (4) 24-hydroxy-11-fucocholestanol, (5) 14-hydroxy-11-fucocholestanol, (6) 11-fucocholestanol, and (7) 14-hydroxy-11-fucocholestanol. The anti-obesity effects of isolated constituents in 3T3-L1 cells. 14-hydroxy-11-fucocholestanol (2) and (7) saringosterol inhibit adipocyte differentiation (Figure 3).

Acknowledgement

This research was supported by High Value-added Food Technology Development Program (11102-001-00000), Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs, Republic of Korea.

gstep Gyeonggi Natural Products Research Institute

제 4 절 추가연구 및 타연구 활용 계획

○ 농수산물인 천연물을 원료로 한 체지방 감소 건강기능성 식품의 개발은 이전에 사용되었던 합성 치료제인 전문의약품과 일반의약품에 의한 거부반응 및 부작용의 우려를 현저히 줄일 수 있으므로 선호하는 시장이 확보되어 있고, 여러 과학적인 검증 단계를 거친 준 치료제 수준의 개별인정형 건강기능식품이 개발된다면 그 시장성은 매우 클 것으로 예상하고 기대함. 최근 제약회사에서 천연물신약개발에 앞서 개발기간이 비교적 짧고 그 효능이 입증된 개별인정형 건강기능식품개발에 대한 니즈는 계속 증가하고 있는 추세임.

○ 따라서 본 연구로 축적된 천연물 기반 항비만 관련 제품개발과정의 연구데이터를 활용하여 천연물 신약개발에 적용할 수 있다면 다양한 연구노하우를 활용한 인력 및 기간 등을 단축할 수 있으므로, 국내의 농산물 (천연물) 관련 건강기능성 식품 개발 및 천연물신약개발 분야의 연구수준의 발전 기여도가 매우 높을 것으로 기대함.

○ 본 사업을 통해 예비 인체적용시험을 진행한 결과 체지방량의 감소 효능을 확인하였으므로, 향후 원료의 대량 확보에 따른 최적엑스를 제조하여 참여기관인 (주)테라젠이텍스에서 본 인체적용시험이 잘 진행될 수 있도록 후속연구를 지속적으로 지원 할 계획임.

○ 곰솔 또한 향후 개발 가능성을 타진 후 비만치료제 후보물질로서의 원료의 작용기전을 탐색해 볼 의의가 있으며, 이를 통해 도출된 우수한 연구기술을 제품화 가능 기업에 기술이전 할 수 있도록 지속적으로 노력할 계획임.

제 6 장 참고문헌

1. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. Rosen ED, Spiegelman BM. *Nature*. (2006), 444, 847-853.
2. Adipocyte-specific gene expression and adipogenic steatosis in the mouse liver due to peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 (PPARgamma1) overexpression. Yu S, Matsusue K, Kashireddy P, Cao WQ, Yeldandi V, Yeldandi AV, Rao MS, Gonzalez FJ, Reddy JK. *J Biol Chem*. (2003), 278, 498-505.
3. Adiponectin and adiponectin receptors. Kadowaki T, Yamauchi T. *Endocr Rev*. (2005), 26,439-451.
4. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. Paul Trayhurn and I. Stuart Wood. *British Journal of Nutrition*. (2004), 92, 347-355
5. Bioactive carotenoid, fucoxanthin as chemotaxonomic marker and antioxidative agent from the marine bacillariophycean microalga *Hantzschia marina*. Choi JS, Lee WK, Cho YJ, Kim DS, Kim A, Chung HY, Jung JH, Im KS, Choi WC, Choi HD, Son BW. *Nat Prod Sci*. (2000), 6, 122-125.
6. Bioactive natural compounds from *Prosopis africana* and *Abies nobili*. Elmezughi, J.; Shittu, H.; Clements, C.; Edrada-Ebel, R. A.; Seidel, V.; Gray, A. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. (2013), 3, 40.
7. Childhood obesity: behavioral aberration or biochemical drive? Reinter preting the First Law of Thermodynamics. RH Lustig. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*. (2006), 8, 447-458.
8. Constituents of *Machilus thunbergii* bark and inhibition of cyclin-de pendent kinases (CDKs) by procyanidin B2. Shrestha, S.; Park, J. H.; Lee, D. Y.; Cho, J. G.; Yoo, J. S.; Yeon, S. W.; Kang, H. C.; Baek, N. I. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*. (2011), 54, 998.
9. Evaluation of anti0inflammatory effect of fucoxanthin isolated from brown algae in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. Soo-jin Heo, Weon-Jong Yoon et al., *Food and Chemical Toxicology*. (2010), 48, 2045-2051.
10. Fatty acids in cell signalling: modulation by lipid binding protein, Prostaglandin. Glatz JF, Borchers T, Spener F, van der Vusse GJ. *Leukot Essent Fatty Acids*. (1995), 52, 121-127.
11. Hormonal signaling and transcriptional control of adipocyte differ entiation. Morrison RF, Farmer SR. *J Nutri*. (2000), 130, 3116-3121.
12. Investigation of the antifouling constituents from the brown alga *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt. Alexandra Bazes Alla Silkina et al., *J. Appl. Phycol*. (2009), 21, 395-403.

13. Isolation of 24-hydroperoxy-24-vinylcholesterol and fucosterol from the brown alga *Turbinaria conoides*. Sheu JH, Sung PJ. *J Chin Chem Soc.* (1991), 38, 501–503.
14. Lignans from the Root of *Rhodiola crenulata*. Yang, Y. N.; Liu, Z. Z.; Feng, Z. M.; Jiang, J. S.; Zhang, P. C. *J. Agric. Food Chem.* (2012), 60, 964.
15. Neolignan and flavonoid glycosides in *Juniperus communis* var. *depressa*. Nakanishi, T.; Iida, N.; Inotami, Y.; Murata, H.; Inada, A.; Murata, J.; Lang, F. A.; Iinuma, M.; Tanaka, T. *Phytochemistry.* (2004), 65, 207.
16. Obesity and the Regulation of Energy Balance. Spiegelman BM, Flier JS. *Cell.* (2001), 104, 531–543.
17. Phenolic and Lignan Glycosides from the Butanol Extract of *Averrhoa carambola* L. Root. Wen, Q.; Lin, X.; Liu, Y.; Xu, X.; Liang, T.; Zheng, N.; Kintoko, K.; Huang, R. *Molecules* (2012), 17, 12330.
18. Phloroglucinol compounds of natural origin. Inder Pal Singh and Sandip B. Bharate. *Nat. Prod. Rep.* (2006), 23, 558 - 591.
19. PPAR γ ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, Kihara S, Nishizawa H, Kishida K, Nagaretani H, Matsuda M, Komuro R, Ouchi N, Kuriyama H, Hotta K, Nakamura T, Shimomura I, Matsuzawa Y. *Diabetes.* (2001), 50, 2094–2099.
20. PPAR γ 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. *Mol Cell Biol.* (1995), 15, 351–357.
21. Resin Diterpenes from *Austrocedrus chilensis*. Olete, V. R.; Usandizaga, O. G.; Schmeda-Hirschmann, G. *Molecules.* (2011), 16, 10653.
22. Saponins (Ginsenosides) from stems and leaves of *Panax quinquefolium* prevented high-fat diet-induced obesity in mice. Wencong Liu, Yinan Zheng, Likun Han, Haimin Wang, Masato Saito, Mingsong Ling, Yoshiyuki Kimura, Yixiong Feng. *Phytomedicine.* (2008), 15, 1140 - 1145.
23. Adipocyte differentiation: a transcriptional regulatory cascade. Burn RP, Kim JB, Hu E, Altiock S, Spiegelman BM. *Curr Opin Cell Biol.* (1996), 8, 826–832.
24. Sterols from *Lindera glauca* Blume Stem Wood. Huh GW, Park JH, Shrestha S, Lee YH, Ahn EM, Kang HC, Baek NI. *J Appl Biol Chem.* (2011), 54, 309–312.
25. Sterols from *Sargassum oligocystum*, a brown algae from the Persian Gulf, and their bioactivity. Parisa Perme, Soodabeh Saeidnia et al., *Nat. Prod. Res.* (2012), 26, 774 - 777.
26. Structures and accumulation patterns of soluble and insoluble phenolics from Norway spruce needles. Strack, D.; Heilemann, J.; Wray, V.; Dirks, H. *Phytochemistry.* (1989),

- 28, 2071-2078.
27. Terpenoids and phenols from *Taiwania flousiana*. Xiang, Y.; Yang, S. P.; Zhan, Z. J.; Yue, J. M. *Acta Botanica Sinica*. (2004), 46, 1002-1008.
28. The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipotrophy and obesity. Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, Mori Y, Ide T, Murakami K, Tsuboyama-Kasaoka N, Ezaki O, Akanuma Y, Gavrilova O, Vinson C, Reitman ML, Kagechika H, Shudo K, Yoda M, Nakano Y, Tobe K, Nagai R, Kimura S, Tomita M, Froguel P, Kadowaki T. *Nat Med* (2001), 7, 941-946.
29. The role of the endocannabinoid system in lipogenesis and fatty acid metabolism. Roberto Vettor, Claudio Pagano. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. (2009), 23, 51 - 63.
30. Transcriptional regulation of adipogenesis. Rosen ED, Walkey CJ, Pui gserver P, Spiegelman BM. *Genes & Dev* (2000), 14, 1293-1307.
31. 경단구슬모자반(*Sargassum muticum*) 추출물의 항산화 및 항균활성. 김지영, 이정아, 김길남. *한국식품영양과학회지*, 36(6), 663-669.
32. 비임상시험관리기준. 식품의약품안전처, (2013) 고시 제 2013-40 호.
33. 의약품등의 독성시험기준. 식품의약품안전처, (2013), 고시 제 2013-121호.
34. 의약품등의 독성시험 기준 해설서. 식품의약품안전청 국립독성연구소, (1999).
35. 의약품 등의 안전에 관한 규칙 및 의약품 임상시험 관리기준. KGCP, (2013), 의약품 등의 안전에 관한 규칙 별표 4.
36. 한국산 갈조식물 모자반속(*sargassum*)의 분류. 옥정현, 이인규. *Algae*. (2005), 20(2), 77-90.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.