

(옆면)

(앞면)

115015-3

국내 농산물인 고추씨와 소나무껍질 추출물을 이용한 체지방 감소  
기능성 식품의 개발 최종보고서

2019

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( ), 비공개( ), 발간등록번호( O )

고부가가치식품기술개발사업 2019 최종보고서

11-1543000-002824-01

국내 농산물인 고추씨와 소나무껍질 추출물을 이용한  
체지방 감소 기능성 식품의 개발  
최종보고서

2019. 07. 19.

주관연구기관 / (주)노바렉스  
협동연구기관 / 목포대학교  
국민대학교

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

‘국내 농산물인 고추씨와 소나무껍질 추출물을 이용한 체지방 감소 기능성 식품의 개발’  
(연구개발 기간 : 2015. 10. 23. ~ 2019. 04. 22.) 과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2019. 07. 19.

주관연구기관명 : (주)노바렉스  
협동연구기관명 : 목포대학교 산학협력단  
                          국민대학교 산학협력단

권석형  
이상찬  
차주현



주관연구기관책임자: 민복기  
협동연구기관책임자: 김현아  
  고광웅

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	115015-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2015. 10. 23 ~2019. 04. 22	단 계 구 분	3차년도/ 3차년도
연구사업명	단 위 사 업	고부가가치식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	국내 농산물인 고추씨와 소나무껍질 추출물을 이용한 체지방 감소 기능성 식품의 개발			
연구책임자	민복기	해당단계 참여연구원 수	총: 12명 내부: 12명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 210,000천원 민간: 70,000천원 계: 280,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 36명 내부: 36명 외부: 명		총 연구개발비
연구기관명 및 소속부서명	목포대학교 산학협력단 국민대학교 산학협력단			참여기업명 (주)노바렉스	
국제공동연구 위탁연구	상대국명: 연구기관명: 중앙대학교 산학협력단			상대국 연구기관명: 연구책임자: 이민원	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

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

9대 성과 등록·기탁번호

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

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

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

<p>요약</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료의 표준화 및 대량 추출 공정 확립</li> <li>- 원료의 지표물질 분석 및 분석법 밸리데이션</li> <li>- 개별 및 복합물의 항비만 효과 및 기전 구명</li> <li>- 개별 및 복합물의 인슐린 저항성 및 지질대사 관련 효과 구명</li> <li>- 개별 및 복합물의 인체적용시험 수행</li> <li>- 건강기능식품 기능성 원료인정 신청 접수</li> <li>- 원료 사업화를 위한 시제품 제작 및 마케팅 활동</li> </ul>	<p>보고서 면수 170 page</p>
---	----------------------------

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>○ 연구의 목적</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 국내 농산물 자원 중 체지방 감소 및 당뇨 개선기능을 가지는 유효한 소재를 선정한 후, 개별 및 복합 기능성 소재의 표준화 진행</li> <li>2) 개별 및 복합 기능성 소재의 체지방 감소/인슐린 저항성 억제 효과 확인 및 작용기전 구명</li> <li>3) 인체효능검증을 통한 복합 기능성 소재의 기능성 원료 인정 1건 신청</li> <li>4) 개발된 원료의 상용화방안 모색 및 마케팅활동</li> </ol> <p>○ 연구의 내용</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 국내 농산물 자원 중 체지방 감소 및 당뇨병 개선 유효 소재의 표준화             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 원료의 수급처 확보 및 추출공정법 확립</li> <li>- 지표물질 선정 및 분석법 밸리데이션</li> </ul> </li> <li>2) 개별 및 복합 기능성 소재의 항비만 기능성 확인 및 작용기전 구명             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포주(지방) 실험을 통해 개별/복합 기능성 소재의 항비만 효과 연구</li> <li>- HFD 비만 동물모델을 통해 기능성 소재의 항비만 효과 검증</li> </ul> </li> <li>3) 개별 및 복합 기능성 소재의 인슐린저항성 및 지질생합성 억제 효과 구명             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포주(간, 근육) 실험을 통해 개별/복합 기능성 소재의 인슐린 저항성 및 지질 생합성 억제 효과 연구</li> <li>- db/db 인슐린저항성 동물모델을 통해 기능성 소재의 효과 검증</li> </ul> </li> <li>4) 인체적용시험을 통한 개별/복합 기능성소재의 효과 검증             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유효성 평가에 따른 ‘체지방 감소’ 효과 확인</li> <li>- 안전성 평가에 따른 개별/복합 기능성 소재의 안전성 검증</li> </ul> </li> <li>5) 건강기능식품 기능성 원료 인정 신청 (개별인정형 등록 신청)</li> <li>6) 원료의 제형 검토/시제품 개발 및 고객사 마케팅</li> </ol>
<p>연구개발성과</p>	<p>○ 원료의 표준화</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 원물 수급처 확보 및 산지별 고추씨 동등성 확인</li> <li>2) 추출법의 표준화, scale-up 및 제조공정 확립 (SD: spray dry)             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 고추씨 대량생산 공정 확립 : 30% 말토덱스트린 첨가</li> </ul> </li> <li>3) 고추씨, 파인엑솔 지표물질 선정 및 분석법 밸리데이션             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 파인엑솔 : procyanidin, Taxifolin, (+)-catechin 설정 및 밸리데이션</li> <li>- 고추씨 : Icariside E5, Vanilloylicariside E5 설정 및 밸리데이션 (개별인정 신청 시, 1개 선택)</li> </ul> </li> <li>4) 원료의 품질 및 위해물질 규격 확립</li> </ol> <p>○ 개별 및 복합 기능성소재의 항비만 효과 구명</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 고추씨, 파인엑솔 각각의 항비만 효과 검증 확인             <ul style="list-style-type: none"> <li>- 추출온도에 따른 효과 확인 후 고추씨 50℃, SD추출물로 추가실험</li> </ul> </li> </ol>

	<p>수행 결정</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포시험에서 고추씨 추출물의 지방합성 관련 단백질 발현 억제 확인</li> </ul> <p>2) 복합물에 대한 항비만 효과 검증 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포시험에서는 복합물의 시너지 효과 확인하지 못함</li> </ul> <p>3) HFD 동물모델에서 개별 및 복합 추출물의 항비만 효과 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 고추씨 200mg/kg 섭취군에서 유의하게 몸무게 및 체지방 감소 효과 확인</li> <li>- 파인엑셀 및 복합물의 경우, 감소 경향은 있었으나 유의한 차이 없었음</li> </ul> <p>4) 개별 및 복합 기능성 소재의 항비만 작용기전 구명</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포기반 실험 결과, FAS, p-ACC, ACC, FABP4 유의하게 감소 및 AMPK pathway에 영향을 미침을 확인함</li> <li>- 동물실험 결과, 고추씨 추출물 200mg/kg에서 TG, TC, HOMA-IR이 유의적으로 감소, PPAR-<math>\gamma</math>, C/EBP <math>\alpha</math>, SREBP-1c, FAS, FABP4 감소 및 AMPK pathway에 영향을 미침을 확인함</li> <li>- 파인엑셀 및 복합군에서는 유의한 차이가 나오지 않음</li> </ul> <p>○ 개별 및 복합물의 인슐린 저항성 및 지질 생합성 억제 효과 구명</p> <p>1) 근육세포에서 혈액에서 근육으로 당흡수에 관여하는 GLUT4의 발현 증가 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 근육세포로 포도당 흡수 조절하는 GLUT4가 고추씨 추출물에서 유의하게 증가함</li> <li>- 파인엑셀에서는 경향이 있으나 유의한 차이를 보이지 않음</li> </ul> <p>2) 간세포를 이용하여, 파인엑셀이 중성지방(TG)과 총콜레스테롤(TC)의 감소 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 간에서 당신생합성을 유도하는 G6Pase, PEPCK이 발현이 파인엑셀과 고추씨 추출물에서 유의하게 감소→두 소재가 당대사 조절기능 있음을 시사함</li> </ul> <p>3) 제 2형 당뇨병이 유발된 마우스 모델을 통한 개별 및 복합물의 체지방 감소 및 혈당 개선 효과 검증</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 파인엑셀, 고추씨 추출물, 복합물의 항비만 및 체지방 감소 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>: 체중 및 체성분 분석 결과, 단일 및 복합물의 체지방 감소 효과 없음</li> </ul> </li> <li>- 파인엑셀, 고추씨 추출물, 복합물의 혈당 감소 및 인슐린 저항성 개선 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 고추씨 추출물과 1:2 복합물의 혈당 감소 및 인슐린 저항성 개선 효과 <ul style="list-style-type: none"> <li>: 고추씨 200 mg/kg과 1:2 복합물에서 혈당 감소 및 혈중 인슐린 감소</li> <li>: 경구내당능검사(OGTT)에서 간의 당신생합성 억제를 통한 혈당 감소</li> <li>: 체중 및 체성분 분석 결과, 단일 및 복합물의 체지방 감소 효과 없음</li> </ul> </li> <li>- 혈당 감소 및 인슐린 저항성 개선 세부기전 구명 <ul style="list-style-type: none"> <li>: 고추씨 200 mg/kg과 1:2 복합물에서 간 포도당신생합성에 관여하는 AMPK와 FoxO1 인산화의 증가와 G6Pase와 PEPCK의 발현량의 감소 확인 → 간의 포도당 합성억제를 통해 제 2형 당뇨병의 혈당</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
--	--

	<p>개선 기전 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 이상지질혈증 및 염증인자 개선 검증 <ul style="list-style-type: none"> <li>: 고추씨 200 mg/kg과 1:2 및 1:4 복합물에서 혈중 중성지방(TG) 감소</li> <li>: 고추씨 200 mg/kg과 1:2 복합물에서 혈중 유리지방산(FFA) 감소</li> <li>: 1:2 복합물에서 TNF-<math>\alpha</math> 와 IL-6의 감소 확인</li> </ul> </li> </ul> <p>○ 개별 및 복합 기능성 소재의 인체적용시험 수행</p> <p>1) 인체적용시험법 확립 및 시험 수행</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- DBP, RCT, 단일기관 시험 (수원 성빈센트병원 선정)</li> <li>- 대조군, 시험군1(RPE), 시험군2(RPEC), 12주 섭취</li> <li>- 마커: 체지방률(DEXA, CT), BMI, 체중, 허리둘레, WHR, 랩틴, 아디포넥틴</li> </ul> <p>○ 건강기능식품 기능성 원료 인정 신청 (개별인정형 등록 신청)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- ‘체지방 감소에 도움을 줌’, 고추씨추출물등 복합물 970 mg/일</li> </ul> <p>○ 제형/시제품 개발 및 원료의 상용화를 위한 마케팅 활동</p> <p>1) 제형검토 및 제형의 안전성 검토</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시험식품 생산 후 0, 1, 3, 6개월 간격으로 유해물질 검사</li> </ul> <p>2) 시제품 제작 및 품목제조신고</p> <p>3) 원료의 산업화를 위해 해외박람회 및 국내 고객사에 원료 소개</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>○ 가치가 낮은 농산물 및 그 부산물을 고부가가치산업에 이용함으로써 농가소득 증대에 기여할 수 있음</p> <p>○ 식단의 서구화 및 에너지의 과잉시대에서 보건산업의 중요한 과제로 떠오르는 ‘비만’ 과 ‘당뇨’ 두가지 기능성을 함께 연구함으로써 다기능성을 가진 기능성 원료의 개발을 통해 국민 건강에 이바지 할 수 있음</p> <p>○ 동물실험 및 인체적용시험을 통해 얻어진 유효한 결과를 바탕으로 건강기능식품 기능성 원료 인정 등록</p> <p>○ 건강기능식품 또는 기능성 원료로 판로를 개척하여 국내 원료시장의 폭을 넓히고 건강기능식품 시장을 활성화하고자 함</p> <p>○ 국내에서 자생하는 원료를 바탕으로 개발된 기능성 소재이므로 나고야의정서에서 자유로우며 해외 수출을 통해 외화 획득을 도모할 수 있음</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>체지방 감소</p>	<p>인슐린 저항성</p>	<p>고추씨</p>	<p>파인엑셀</p>	<p>건강기능식품</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Weigh Loss</p>	<p>Insulin resistance</p>	<p>Red pepper seed</p>	<p>PineXol® (Red Pine Bark)</p>	<p>Health Functional Food</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

< 목 차 >

제 1 장. 연구개발과제의 개요 .....	7p
제 1 절. 연구개발 목적 .....	7p
제 2 절. 연구개발의 필요성 .....	8p
제 3 절. 연구개발 범위 .....	13p
제 2 장. 연구수행 내용 및 결과 .....	14p
제 1 절. 연구개발 추진체계 및 추진전략 .....	14p
제 2 절. 연구개발 접근방법 .....	18p
제 3 절. 연구개발 추진 일정 및 결과 요약 .....	29p
제 4 절. 원료의 표준화 .....	41p
제 5 절. 전임상(in vitro, in vivo) 실험을 통한 효과 검증 .....	74p
제 6 절. 인체적용시험을 통한 체지방 감소 효과 확인 .....	121p
제 7 절. 제형 검토 및 시제품 제작 .....	150p
제 8 절. 기능성 원료 인정 신청(개별인정신청) .....	153p
제 9 절. 연구개발 성과 .....	158p
제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도 .....	163p
제 1 절. 연차별 정량적 성과 목표 및 달성도 .....	163p
제 2 절. 연차별 정성적 성과 목표 및 달성도 .....	163p
제 3 절. 성과 요약 .....	165p
제 4 절. 목표미달성 시 원인 및 차후대책(후속연구의 필요성 등) .....	166p
제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등 .....	167p
제 1 절. 연구결과의 차별성 및 시장 경쟁력 .....	167p
제 2 절. 향후 연구개발결과의 활용계획 .....	169p

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발 목적

### 1. 최종목표

- 표준화 확립 : 대량공정 확립, 지표성분 확립, 지표성분 분석법 확립(밸리데이션)
- 개별 및 복합물의 항비만 효과 구명
- 개별 및 복합물의 당대사 기전 확인을 통한 항비만 효과 구명
- 안전성확보 및 인체효능검증 통한 원료의 개별인정형 1건 등록 신청
- 부작용이 없고 체지방 감소 기능이 우수한 건강기능식품의 개발 및 상용화

### 2. 1차년도 목표

- 원료의 표준화 : 추출공정법 확립 및 지표성분, 지표성분 분석법 확립
- 전구지방세포 및 고지방 식이 동물 모델을 이용한 개별 및 복합물의 항비만 효과 구명
- 근육 및 간세포에서 개별 및 복합물의 인슐린 저항성 및 지질 생합성 억제 효과 구명

### 3. 2차년도 목표

- 원료의 대량추출: 인체적용시험을 위한 표준화된 원료 추출
- 제형개발 : 임상시험용 제형 개발
- 인체적용시험 : 시험법 확립 및 시작
- 전구지방세포 및 고지방 식이 동물모델을 이용한 항비만 기작 구명
- 유전적 당뇨병 db/db 동물모델을 활용한 항비만, 인슐린 저항성, 고지혈증, 지방간 개선 연구 및 병태생리학적 변화 측정과 세부 작용기작 구명

### 4. 3차년도 목표

- 원료 추출 표준화 확립 : 균질한 원료의 대량생산법 확보
- 인체적용시험 수행 : 인체적용시험 완료 및 결과 분석 완료
- 개별인정 등록 신청
- 제품화 방안 모색 : 일반식품 및 개별인정 후 판매를 위한 관련 업체에 원료 프로모션 진행



## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 1. 국내외 연구동향

#### 가. 건강기능식품 현황

##### (1) 국내외 당뇨 및 인슐린 저항성 개선 관련 건강기능성 소재 개발 현황

- 2010년 기준 세계적으로 총 3,760억 달러가 당뇨병 예방 및 치료를 위한 비용으로 사용됨. 이에 따른 당뇨병 치료제 시장은 급격하게 성장 중으로 2016년에는 약 443억 달러 규모로 시장이 성장할 것으로 예상함(Datamonitor, 2010)
  - : 미국은 2012년 기준 11억 달러 이상을 당뇨병 관련 연구에 재정 지원하는 것을 조사됨
  - : 일본은 2011년 기준 당뇨병을 포함한 습관성 만성질환 개선을 위한 연구에 34억 엔을 지원하였고, 기술개발 외에 국민운동, 식사지도, 예방방안 등 종합적인 대책을 수립하여 추진 중에 있음
- 우리나라는 당뇨병 치료제 시장의 규모가 2010년 4,401억 원에서 2016년 9,300억 원으로 시장이 성장할 것으로 예상함(유한양행, 2012)
- 우리나라의 경우 2011년 기준 농림부, 복지부, 지경부, 교과부 등에서 총 277억 원을 당뇨병 국가연구개발 분야에 재정 지원하였으며 그 규모가 꾸준히 증가하고 있음
- 국내의 경우 식품의약품안전처장이 별도로 인정한 원료 또는 성분 중 식후 혈당 상승 억제에 도움을 주는 물질을 검증하여 고지하고 있음. 다음과 같은 물질들이 ‘높은 혈압 감소’에 도움을 주는 소재로 등록되어 있음
  - : 구아바잎 추출물, 난소화성 말토덱스트린, 동결건조누에분말, 마주정추출물, 바나바잎 추출물, 솔잎증류농축액, 알부민, 인삼가수분해농축액, 지각상엽추출혼합물, 서목태 펩타이드 복합물, 콩발효 추출물, 타가토스, 달맞이꽃종자추출물, 피니톨, 홍경천등복합추출물, nopal 추출물, 실크단백질효소 가수분해물, 상엽추출물, 계피추출분말, 히드록시프로필메틸셀룰로오스 등이 2015년 현재 등록되어 있음
- 그러나 실질적으로 항당뇨 및 인슐린 저항성 개선 건강기능식품으로 시장에서 다수의 소비자들로부터 선택을 받은 제품은 없는 상황임. 따라서 인체에 무해한 천연물 유래 항당뇨 및 인슐린 저항성 개선 건강기능식품의 개발과 과학적, 객관적 근거를 통한 소비자들의 신뢰를 얻는 것이 중요할 것으로 판단됨

##### (2) 국내외 비만관련 건강기능식품 요구도 증가

- 미국의 경우 성인 31%가 비만으로 인한 고지혈증을 갖고 있는 것으로 파악되고 있으며, 특히 대사증후군 관련 기준치를 초과한 사람들의 경우 고지혈증의 확률이 2배 이상 높은 것으로 알려져 있음
- 한국에서도 급격히 서구화되어가는 삶의 방식 변화에 의해 최근 비만과 이로 인한 고지혈증 유병 인구수가 전 연령층에 걸쳐 급격히 증가하고 있어 이로 인한 사회경제적 손실이 막대함
- 건강기능식품 소비자 요구도 및 기업체 연구 분야 우선순위에서 비만분야가 우위임
  - : 한국건강기능식품협회에서 소비자를 대상으로 건강기능식품 요구도 우선순위를 조사한 결과, 1위가 비만 38%, 2위가 면역력 증진 22%, 3위가 아토피 순으로 나타남
  - : ‘2007년도 바이오푸드네트워크 사업보고서’에 의하면, 기업체의 우선 연구분야로 비만, 면역기능, 콜레스테롤, 당뇨 등 대사질환분야가 우위를 차지함

- 2013년 개별인정 된 기능성은 체지방감소가 7건으로 가장 많았고, 피부건강 6건, 관절·뼈 건강 5건 순으로 다이어트 및 피부건강 기능성 인정이 많았음
- 지난 10년(04~13)동안 가장 많이 인정받은 기능성은 체지방 감소가 79건으로 가장 많았음

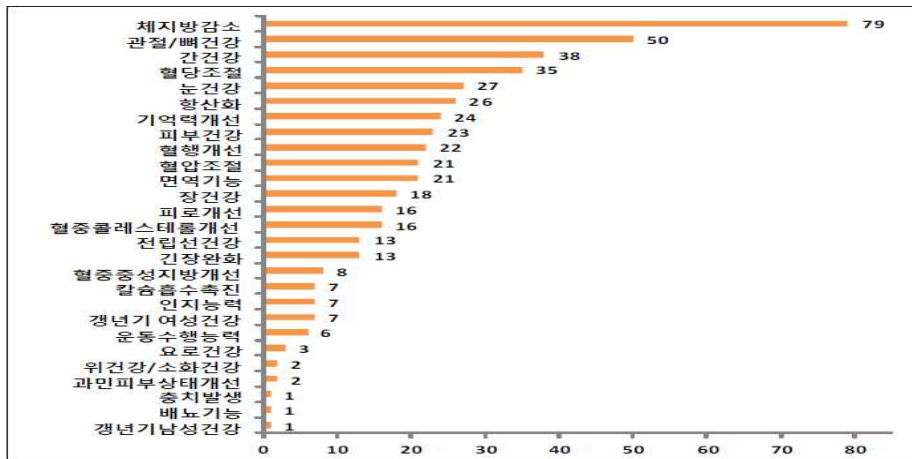


Fig 1. 10년간(04~13) 기능성 인정 현황

- ‘건강기능식품 기능성평가 가이드’ 에 따르면 가르시니아 캄보지아 껍질 추출물, 미역 등 복합추출물(잔티젠), 키토산, HCA, L-carnitine 등임



Fig 2. 체지방 감소 기능성을 인정받은 건강기능식품 제품

- 또한, 국내의 건강기능식품 고시형 생산실적을 보면, 급격한 성장세를 나타낸 제품으로는 체지방 감소 제품인 가르시니아캄보지아 추출물이 2011년 207억에서 2012년 440억으로 112.56%로 가장 높았고, 또한, 개별인정형 생산실적에서는 체지방 감소와 관련하여 그린 마테추출물과 대두배아열수추출물등 복합물이 2011년까지는 생산실적이 거의 없는 상황에서 2012년 생산실적이 두드러지게 나타남
- 향후 우리나라 항비만 건강기능식품 시장 동향에 있어서는 제품의 가격, 신용도 및 기능성, 매체 등을 통한 접근의 용이성, 브랜드 인지도 등에 따라 제품 간의 경쟁이 보다 심화될 전망이다. 개인 및 중소기업들의 경우는 특허에 기반한 제품의 홍보 및 판매에 주력할 것이며, 대기업들은 자체의 연구를 통해 기능성이 증가된 노하우(know-how) 중심의 제품 개발 및 판매를 지속할 것으로 전망됨

## 나. 연구개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

### (1) 천연물 유래 기능성 물질 필요성

- 천연물을 기원으로 하는 생약들은 한방에서 오랜 기간 사용되어 왔다는 사실만으로 널리 사용되어 올뿐 체계적인 제조, 품질관리, 유효기간 및 사용상의 주의사항 등에 대한 과학적인 근거가 미 확보된 상태로 이에 대한 대처가 시급한 실정임. 이러한 이유들로 인해 안정성이 확보된 천연물로부터 체중조절에 효과적이면서 부작용이 적은 기능성 물질을 찾아 내어 작용기전에 따라 건강식품이나 의약품으로 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있음

### (2) 고추씨의 기능성

- 고추는 가지과의 한해살이풀에 속하는 고추(*Capsicum annuum* L.) 또는 그 변종의 열매로 원산지는 남미이며 현재 우리나라를 비롯한 동남아 지방에서 널리 이용하고 있는 주요 향신료임
- 고추는 2011년 국내 재배면적이 42,574ha로 채소류 가운데 가장 넓으며, 10a당 수량은 181kg, 총 생산량은 77,110톤, 생산액은 1조 2,939억원에 이르는 주요 조미채소임. 고춧가루는 연간 7만 톤이 생산되고 있으며 부산물로 약 17,580톤의 고추씨가 생산되고 있음
- Capsaicin의 효능에 대한 연구로는 체액성 면역능 향진과 암유전자 발현 조절작용 및 항성인병 효과, 기능성 소화불량, 에너지 대사율 향진, 살균작용, 3T3-L1 세포에서 세포자멸사 유도 및 지방생성억제 등의 효과가 있음이 보고되고 있음. 또한, quercetin, capsaicinoids, luteolin,와 같은 항산화 물질인 phenolic 화합물을 함유하고 있어 다양한 분야에 걸쳐 연구가 진행되고 있음
- 국내 건고추의 경우 고추 태좌(2.8-3.0%), 고추씨(25.2-28.8%), 과피(65.2-62.3%), 꼭지(6.7-8.0%)의 비율이며 씨의 함량이 10% 미만인 외국산 고추에 비하여 고추씨 함량이 대단히 높음
  - 고추씨의 비율이 높으면 고춧가루 고유의 붉은색과 맛이 저하된다고 해서 고품질 고춧가루 제조 시 과피와 고추씨를 분리하고 10%의 고추씨만 과피에 첨가하므로 약 15% 정도는 부산물로 남게 됨
- 건고추 씨는 수분 10% 미만, 조단백질 15-17%, 지방 25-30%, 조섬유 35-45%를 함유하고 있는 양질의 식품소재이나 기름으로만 일부 사용하고 있음- 그러나 고추씨 기름은 불포화지방산인 리놀레산(linoleic acid)를 68-72%정도 함유하고 있어 저장, 가공 중 산패가 쉽게 일어나기 때문에 그 수요가 제한적임
- 고추를 소재로 한 기존의 연구는 대부분 캡사이신의 기능에 국한되어 연구됨
  - : 고추씨가 항 돌연변이 효과, 항암 효과 등의 생리활성을 가지고 있다고 보고되고 있지만, 이에 대한 연구나 소재개발은 미비한 실정임
  - : 고추의 캡사이신에 대한 연구와 차별화된 고추씨의 기능성에 대한 연구는 미미하므로 고춧가루 가공 부산물로 버려지거나 뛰어난 생리활성을 가진 고추씨에 대한 기능성의 연구가 필요함
  - : 고추씨를 이용한 응용제품들이 연구되고 있으나 구체적인 in vivo 실험 없이 물김치, 소세지 등의 식품에 응용하고 있는 실정임
- 즉 고추의 캡사이신과 차별화된 고추씨의 기능성에 대한 연구는 미미하므로 고춧가루 가공 부산물로 버려지거나 뛰어난 생리활성을 가진 고추씨에 대한 기능성의 연구가 필요함

### (3) 파인엑솔의 기능성

- 소나무 껍질은 polyphenolic monomer, procyanidins, cinnamic acid 및 glycoside 와 같은 polymer 형태의 폴리페놀 성분이 많이 함유되어 있어 높은 항산화 효과, 항비만, 항균활성, 항염증 활성 및 면역력 증진 등과 같은 다양한 생리활성 효과를 지님
- 피크노제놀(pycnogenol)은 프랑스산 해송 껍질 추출물에서 추출한 플라보노이드 복합체로 monomer 형태의 페놀화합물인 cathchin, epicatechin 및 tamoxifolin과 플라보노이드인 procyanidins 그리고 p-hydroxy benzoic, protocatechuic, gallic, vanillic, p-coumaric, caffeic, ferulic acids 와 같은 다양한 페놀산을 함유하고 있어 항산화 효과가 매우 뛰어나
- U.C, Bekeley의 Lester Packer 박사에 의하면 피크노제놀은 비타민 C이나 비타민 E 보다 강력한 항산화력을 지닐 뿐만 아니라, 산화된 비타민 C를 생체활성적인 형태로 되돌리고 비타민 E를 산화로부터 보호하는 작용을 함
- 또한, 피크노제놀은 창상치유를 촉진시켜주고, MMP-1(matrix metalloproteinase-1), MMP-2, 그리고 MMP-9의 활성을 억제하는 효과도 있어, 주름개선에도 도움을 줄 수 있으리라 추측됨
- 현재 수입되는 피크노제놀의 가격은 1kg 당 400만~500만원 대의 고가임
- 국내 임산 부산물로 생산되는 매년 수천 톤의 적송 껍질은 폐기되고 있는 실정이나, 이를 이용해서 기능성을 검증하면 고부가가치를 지닌 소재로 개발이 가능하며 소나무 껍질 생산 지역 경제 활성화에도 크게 기여할 수 있음
- 소나무 껍질 추출물은 높은 항산화 활성을 가지는 것으로 많은 연구결과를 통해 조사되어 왔으며, 해외에서는 이미 프랑스 해송 껍질 추출물인 피크노제놀에 관한 연구가 많이 이루어진 반면, 우리나라 적송 껍질 추출물인 파인엑솔의 생리활성 효과에 대해서는 아직 연구가 미비함
- 즉 고가의 피크노제놀과 차별화된 파인엑솔의 기능성에 대한 연구는 미미하므로 국내 적송 껍질 부산물로 버려지나 뛰어난 생리활성을 가진 파인엑솔에 대한 기능성의 연구가 필요함

## 다. 기존 연구의 한계 및 전망

### (1) 의약품 유래 비만치료제의 한계

- 비만 치료를 위한 합성 의약품 유래 비만 치료제의 문제점에도 불구하고 비만인구의 증가와 함께 비만치료제의 수요는 급격하게 증가하고 있는 실정임
- 비만의 근본적인 치유 방법은 식습관을 건전하게 개선하며 규칙적인 운동량을 증가시켜서 체중을 감량하는 것이 필요하나 약물처방이나 외과적 수술요법을 병행하여 비만을 예방·치료하고 있음
- 비만치료제는 여러 작용기전에 따라 개발되고 있지만 현재 시판되고 있는 비만 치료제는 sibutramine과 같이 중추신경계에 작용하여 식욕을 억제시키거나 orlistat 제제와 같이 지방의 소화를 억제하여 체외로 배출하는 약물이며 위장장애, 복부팽만, 구갈, 불면증, 두통, 혈압상승 등의 부작용을 야기한다고 보고되고 있고, 일부는 항정신성 의약품으로 분류되어 있음
- Orlistatsms 지방분해 효소 억제제로 섭취한 지방의 약 30%가 흡수되지 않고 배설되나 부작용으로 잦은 대변감, 지방변 등이 나타나며 지방흡수율의 감소로 지용성비타민의 흡수율이 떨어질 수 있음
- 또한 최근까지 사용되던 sibutramine(Reductil)과 remonabant(Acomplia)가 자살충동, 우울증, 심혈관 문제등으로 퇴출되었고, 시판되고 있는 약물들도 잠재적 위험성을 가지고 있음



Fig 3. 비만치료제 Reductil, Acomplia

- Sibutramine 제제의 판매 중단 조치로 인한 소비자들의 불안감이 증가하고 있으며 해외 다이어트 제품 중 사용 금지 의약품 성분이 검출되어 판매중지된 제품들도 있음
- 따라서 오랫동안 식품과 약재로 사용되어 안전성이 확보된 식용 및 약용 작물로부터 체중 조절에 효과적이면서 부작용이 적은 기능성물질을 찾아내어 작용기전에 따라 건강식품이나 의약품으로 개발하는 연구가 활발히 진행되고 있음

**(2) 안전하면서도 저렴한 다이어트 제품에 대한 요구도 증가**

- 가르시니아 캄보지아 껍질 추출물의 경우 모두 수입에 의존하고 있으며 추출물 수입 비용 또한 20,000원/kg으로 무시할 수 없는 수준 임
- 그러나 소비자들은 구매 편의성 및 저렴한 가격 등을 이유로 온라인을 통해 다이어트 식품을 구매하고 있으며 이를 개선하기 위해서는 천연물유래의 안전한 다이어트 제품이 저렴한 가격으로 판매될 수 있어야 함
- 고추의 부산물인 고추씨는 그 사용이 제한되어 있어 기능성이 연구되어 건강기능성 식품으로 개발될 경우 수입의존 소재에 비하여 훨씬 저렴한 가격으로 체지방 감소효과를 지닌 건강기능식품의 제공이 가능함
- 파인엑솔 공급 업체인 뉴트라팜의 추출 수율은 피크노제놀의 0.3%보다 훨씬 높은 5%에 달해 뛰어난 가격경쟁력으로 수입대체가 가능하여 국내 소비자들에게 보다 저렴한 가격으로 체지방 감소 효과를 지닌 건강기능식품을 제공할 수 있음
- 따라서 국내 생산이 가능하고 부산물로 버려지고 있는 농산물 소재를 이용한 개별인정을 통한 건강기능성 식품의 개발은 매우 고무적이라 할 수 있음

**(3) 예방적 차원의 기능성 소재 개발에 대한 요구도 증가**

- 우리나라를 비롯한 동양에서는 의식동원(醫食同原)이라 하여 식품과 약은 서로 같아 인체에서의 기능 역시 같다는 생각이 오랫동안 지배해 왔으므로 식생활의 개선이 병을 예방하고 치료할 수 있다는 것을 의미함
- 이러한 예방적 의료개념은 비만이나 이로 인한 만성질환의 예방개념에서 의학계의 치료제

의 개발 못지않게 부작용을 줄이면서 천연자원의 안전성을 이용한 이들 만성질환을 사전에 예방하거나 억제시킬 수 있는 기능성식품의 개발 및 적용을 위한 연구가 절대적으로 필요하다는 의미이기도 함

- 발병 후 치료에 접근하는 방식과 달리 사전 예방적 차원에서 비만의 발달을 제어하는 효율적인 기능성 소재 개발이 필요함
- 현재 효과적인 제어력을 갖는 예방적 차원에서의 기능성 소재 개발은 미흡하며, 특히 조절 신호전달 체계가 상세히 규명되지 않는 경우가 많아 관련 분야 연구가 절실함

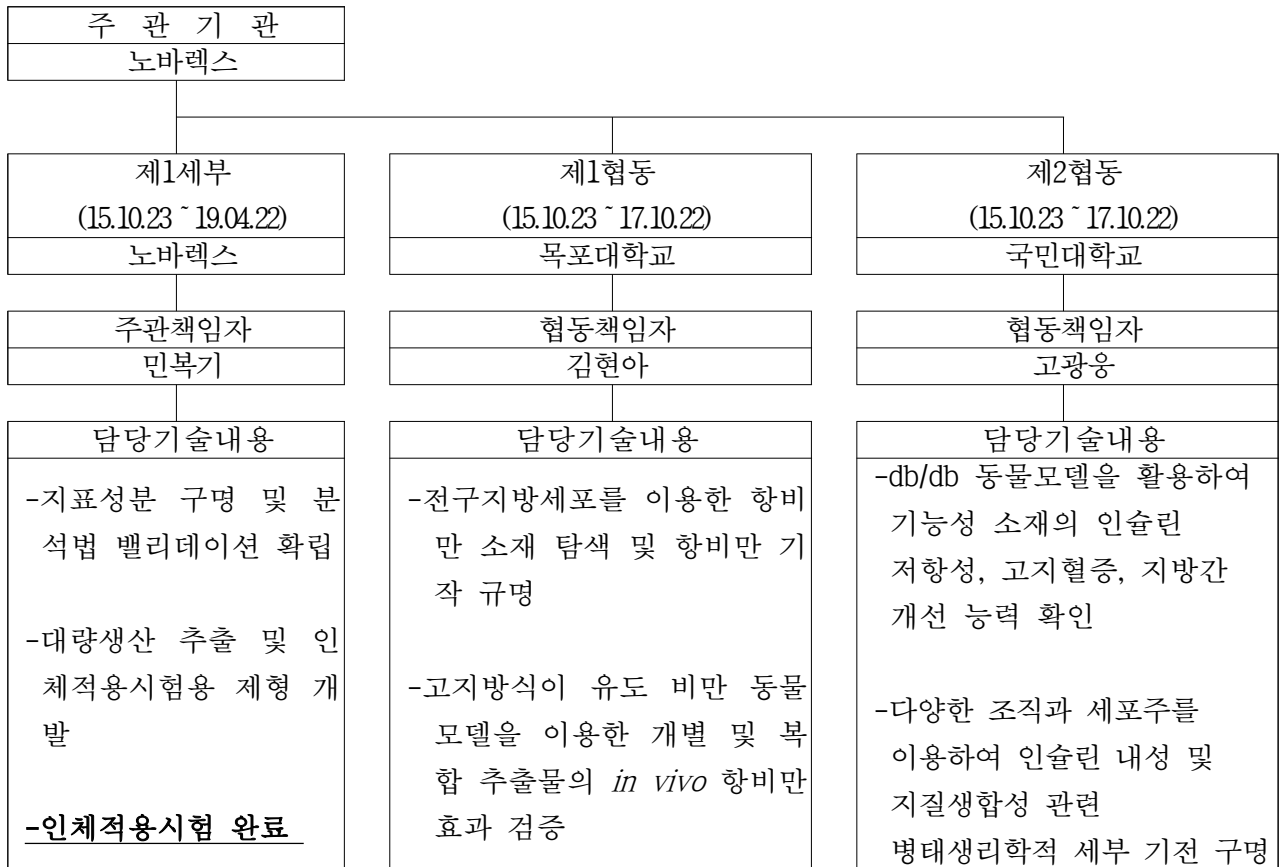
### 제 3 절 연구개발 범위

연구 년도	구분	연구 범위
1차년도	1세부	- 추출 공정 확립 - 지표성분 분석 및 분석법 확립
	1협동	- 개별 및 복합 추출물의 in vitro/ in vivo를 이용한 항비만 효과 검증
	2협동	- 개별 및 복합 기능성 소재의 적정 농도 설정 - 근육세포의 인슐린 내성 개선 효과 검증 - 포도당신생합성 억제 효과 검증 - 간세포의 지질생합성 억제 효과
2차년도	1세부	- 대량추출법 확립 - 인체적용시험 시작 - 지표물질 선정 및 분석법 확립
	1협동	- 개별 및 복합 추출물의 in vitro/ in vivo를 이용한 항비만 효과 검증
	2협동	- 개별 및 복합 추출물의 in vivo를 통한 제2형 당뇨 및 혈당 개선 효과 검증
3차년도	1세부	- 원료 추출 표준화 확립 - 인체적용시험 수행 - 개별인정형 원료 등록 신청 - 제품화방안 모색

## 제 2 장 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구개발 추진체계 및 추진전략

#### 1. 연구개발 추진체계 및 추진전략

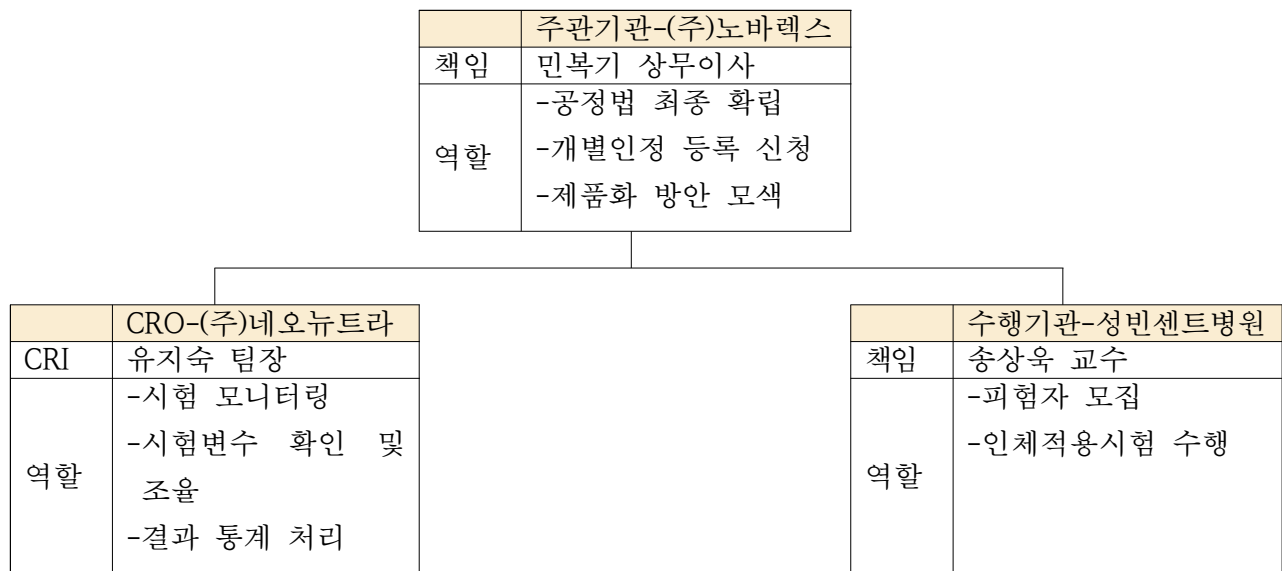


- 본 연구는 구성 연구진의 1) 복합 기능성 소재의 생산, 분리, 정제에 의한 생물학적 활성 분석 경험과 2) 질병모델 실험동물과 세포주를 활용한 대사질환 표현형 확립과 개선 3) 기능성 소재의 생리활성 및 체내 작용기전 검증 등 관련 다년간 축적된 연구 개발 경험을 바탕으로 연구를 수행함
- 개발된 상품의 경우 건강식품 상품화 및 기능성 소재화에 의한 홈쇼핑 판매를 통하여 경험을 축적한 (주)노바렉스의 주관으로 본 과제의 추진을 극대화하고 농산물(고추씨, 적송껍질)을 소재화하여 고부가가치의 기능성 식품을 개발함으로써 농업은 고부가가치 산업으로, 농촌은 녹색산업기반의 발전모델을 제시하며, 국민보건 향상 및 관련 산업의 경쟁력을 향상시키고자함
- 본 연구의 실험재료인 고추씨와 적송껍질 등은 참여기업인 (주)노바렉스에서 공급 및 기능성 소재 제품개발을 담당함. 협동기관인 목포대학교, 국민대학교에서는 (주)노바렉스에서 제공하는 개별 및 복합 기능성 소재의 유효성분 검증 및 대사질환 관련 유전자/단백질 발굴

및 특성 분석을 통하여 항비만, 인슐린 저항성 개선 및 지질저하 등 대사질환 개선 기작을 구명하며 혈액 및 조직별 대사질환 관련 유전자/단백질의 database를 구축함. 이를 바탕으로 농업 부산물 복합 소재의 생리활성 구명 및 기능성 소재화, 가공적성 평가에 의한 물성 연구 등을 수행하여 최종적으로 주관기관인 (주)노바렉스와 공동으로 대량생산 공정 합리화 및 최적화를 통해 건강 기능 식품을 개발하려 함

- 연구인력으로서 (주)노바렉스 주관연구책임자 민복기 외 9명, 협동연구책임자 2명 외 연구원 및 연구 보조원으로 참여하며, 각 기관 책임자들의 분기별 2회 회의를 통한 실험 진행사항 점검 및 문제점 토의, 해결 방안 도출, 기관별로 실험기법 공유 및 인적 시설 교류에 의한 기술지원을 통하여 연구 역량을 극대화 하려함
- 기능성 및 성공적인 제품화를 위한 다양한 분야의 전문가를 확보하고자 함. 국내외 인적 네트워크를 적극적으로 활용하여 초청세미나와 국제 학술회의를 통해 자문과 토론을 진행하고, 본 연구팀과 공동작업 경험이 있는 미국 콜럼비아대학교 의과대학 Dr. Henry Ginsberg(전세계 인슐린 내성/지질대사 항상성 연구 최고 권위자), 미국 예일대학교 의과대학 심혈관계질환 센터장인 Dr. Arya Mani(다양한 유전자 조작 쥐를 활용한 대사질환 연구 분야의 권위자)와 연구 자문을 의뢰함. 또한, 국내외 우수한 대학원생을 적극 유치하여 대사질환 개선 전문 연구인력을 배출할 예정임

## 2. 인체적용시험 추진체계 및 추진전략



### 가. 주관기관- (주)노바렉스의 역할

- 대량공정법 확립
- CRO인 네오뉴트라와 주기적인 미팅을 통하여 일정 및 시험 진행에 대한 모니터링
- 개별인정신청 자료의 모음 및 신청서 작성을 통한 제출 준비



- : 현재까지의 모든 자료를 취합하여, 식약처와 모듬토의 또는 주무관미팅 진행
- : 인체적용시험 결과 분석 완료 후, 바로 최종 신청서에 통합하여 자료 제출
- 일반식품 혹은 건강기능식품으로의 판매를 위한 관련업체에 원료 소개 및 교육 진행

#### **나. CRO 기관- (주)네오뉴트라**의 역할

- 주관기관과 시험수행기관 사이에서 조율
- 인체적용시험 진행에 대한 전반을 지속적으로 모니터링하여 주관기관에 정보 전달(1회/주)
- 변수 발생 시, 주관기관 및 병원과 협의하여 조속한 대안 제공
  - : Ex. 피험자의 모집이 더딜 시, 지하철, 버스, 신문, 원내 등의 광고를 진행하여 원활한 인체적용시험 시험 수행
- 시험 결과에 대한 통계처리 및 IRB 보고

#### **다. 시험수행기관- 성빈센트병원(수원)**의 역할

- 시험 디자인 및 시험 결과에 대한 자문
- 피험자 등록 및 프로토콜에 따른 원활한 과제 수행

### 3. 연구개발 추진일정

추진 일정														
일련 번호	연구내용	추진 일정												책임자 (소속기관)
		'06 1/4	'06 2/4	'06 3/4	'06 4/4	'07 1/4	'07 2/4	'07 3/4	'07 4/4	'08 1/4	'08 2/4	'08 3/4	'08 4/4~	
1	대량생산 공정법 확립-반복 생산	[Progress Bar]												민복기 (주)노바렉스
2	지표성분 분석 및 밸리데이션 확립	[Progress Bar]												
3	인체시험 기관선정	[Progress Bar]												
4	IRB 심의	[Progress Bar]												
5	시험식품 생산 및 참여자 모집	[Progress Bar]												
6	계획수립 및 자료조사	[Progress Bar]												김현아 (목포대학교)
7	전구지방세포에서 개별 추출물의 항비만 기작구명	[Progress Bar]												
8	복합 추출물의 항비만 기작구명	[Progress Bar]												
9	동물모델에서 개별 추출물의 항비만 기작구명	[Progress Bar]												
10	복합 추출물의 항비만 기작구명	[Progress Bar]												
11	학술발표 및 논문투고	[Progress Bar]												
12	실험동물/시료준비	[Progress Bar]												고광웅 (前 국민대학교/ 現 한양대학교)
13	동물실험	[Progress Bar]												
14	당/인슐린 분석	[Progress Bar]												
15	혈액표지자 분석	[Progress Bar]												
16	단백질정량 분석	[Progress Bar]												
17	결과보고서 작성	[Progress Bar]												

## 제 2 절 연구개발 접근 방법

### 1. 원료의 표준화

#### 가. 원료의 공급 확보

- 파인엑솔 : (주)뉴트라팜에서 원료 수급 및 추출물 공급  
적송껍질은 강원도지역에서 벌채된 50년 이상의 적송으로부터 껍질을 채집하여 사용하며, 소나무껍질은 목재 가공과정에서 부산물로 탈락하므로 원료 수급이 용이함. 또한, 원료 제공업체인 뉴트라팜은 강원도 삼척시 도계농공단지 내에 공장을 운영 중으로 인근 제재소로부터 적송껍질을 제공받아 파인엑솔을 생산하고 있음
- 고추씨 : 영양지역 고추 재배 영농조합 및 농협과 재배 계약 추진

#### 나. 추출 업체와의 계약을 통한 추출물의 안정적인 공급망 확보

- 홍천메디칼 허브
- 테코스 등 기존 거래업체

#### 다. 고추씨, 파인엑솔 추출물의 생산

- 개별인정 등록 후, 각 원료 별 연 500kg~2ton 생산. 시장 진입 후, 생산량 증대 계획
- 국내 건강기능식품 시장 우선 진입
  - (1) OEM 방식의 제품 생산 및 최종 판매자를 통한 홈쇼핑, 네트워크 판매 시작
  - (2) 해외 시장 진입: 우선적으로 세계 다국적 회사에 원료 공급을 통한 시장 진입  
: 동남아 시장의 경우, 노바렉스 브랜드로 제품이 수출되고 있어, 동 판매 라인을 통한 관련 기능성의 제품 제조 및 수출

## 2. 지표성분의 구명 및 분석

### 가. 고추씨로부터 지표성분 분리 및 구조결정

- 파인엑솔 및 고추씨 추출물로부터 소재별 지표물질을 분리하고 구조를 결정
- 기존의 문헌과 박층크로마토그래피 (Thin Layer Chromatography, TLC)를 통해 유효 물질의 물성을 파악한 후 TLC monitoring을 동반한 액체크로마토그래피 (Liquid Column Chromatography, LC)기법을 이용하여 효율적으로 지표성분을 분리함
- 잘 건조된 상태의 소재을 열수로 추출하여 농축한 후, 여러 칼럼 크로마토그래피 성에 따라 silica gel 뿐 아니라, sephadex LH-20, MCI-gel CHP 20P, ODS-B gel 등을 이용하고, 고순도 지표성분을 얻기 위한 최종 정제에는 preparative MPLC 또는 preparative HPLC 등을 이용함



Fig 4. Separation system

- 순수하게 단리가 된 지표물질들은 재결정 가능의 유무에 따라 각각의 결정형, m.p. 및 정색반응 등 각종 물리화학적 성상을 보고 각종 정색 시약(Anis aldehyde-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>발색 후 가열, FeCl<sub>3</sub>)에 대해 나타나는 특이한 발색반응을 관찰함
- 지표물질의 구조는 I.R., UV, 1H-13C-NMR을 통해 기본적으로 파악하고, DEPT, COSY, HSQC, HMBC, NOESY, ROESY 와 같은 최신 2D NMR법을 이용하여 당의 결합순서나 각 탄소와 수소의 정확한 귀속을 파악함
- 각종 Mass spectrum (CI-MS, EI-MS, FAB-MS 등)을 통해 지표물질의 분자량 및 fragment peak 등을 확인하여 정확한 구성단위를 파악함. 그 외 입체구조의 문제가 있는 물질은 CD 및 결정화를 유도하여 X-ray crystallography 등을 시도함. 각종 Database의 spectral data를 참고하여 위의 자료와 비교·검토한 후 최종적으로 각 지표물질들의 구조를 결정함

## 나. 지표물질의 HPLC 분석법 확립

- HPLC 분석 조건 확립: 선정된 지표물질의 HPLC분석 조건은 화합물의 화학적 특성을 고려하여 분석 컬럼은 C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, CN, NH<sub>2</sub>과 같은 종류를 선택하고 이동상은 유기 용매의 종류와 조성, 기울기 용리 조건, 완충용액의 pH, 완충용액의 농도, flow rate등의 변화, 검출기의 최적 파장, 컬럼 온도 및 길이 등을 고려하여 지표물질의 최적의 분석 조건을 확립함

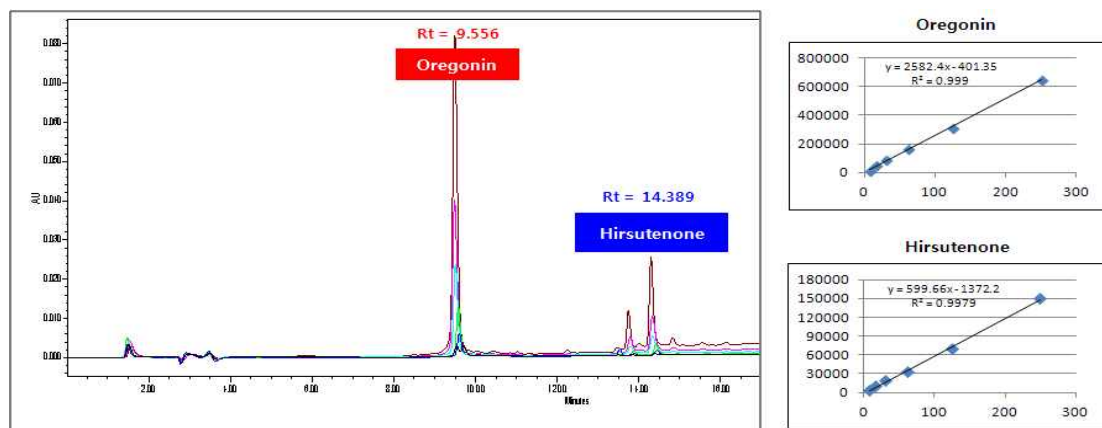
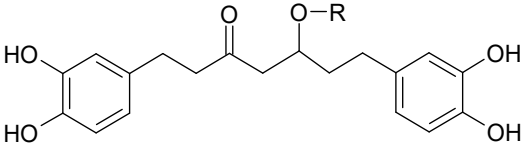
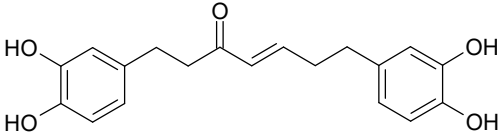


Fig 5. 지표물질의 retention time과 standard curve 예시

Table 1. 지표물질의 HPLC 분석 조건 예시

구조	 <p>(1)</p>	
	 <p>(2)</p>	
성분명	(1) Oregonin (2) Hirsutenone	
기원 식물	<i>Aluns japonica</i>	
분석 방법 및 결과	Column	YMC J'sphere ODS-H80 (150×4.6 mm, 4 μm, 80A)
	Mobile phase	A linear gradient elution of 10–40% Acetonitrile(ACN) in water was run in 0–24 min.
	Flow rate	1.0 mL/min
	Temperature	30° C
	UV	280 nm
	Retention time	(1): Rt 14.66 min (2): Rt 16.30 min

#### 다. 지표물질 함량분석 및 분석법 validation

##### (1) 지표물질 함량 분석

- 파인엑솔 및 고추씨에서 분리한 지표물질을 기준으로 각각의 소재 내 함량을 평가하여 기능성식품 으로서의 가능성을 평가 하고자 함
- 지표물질 함량 평가: HPLC를 이용하여 유기용매의 조성, 유량 등을 변화 시켜가면서 식물 내 지표물질들을 분석할 수 있는 최적의 HPLC 분석 조건을 결정 후 지표물질 함량 확인함

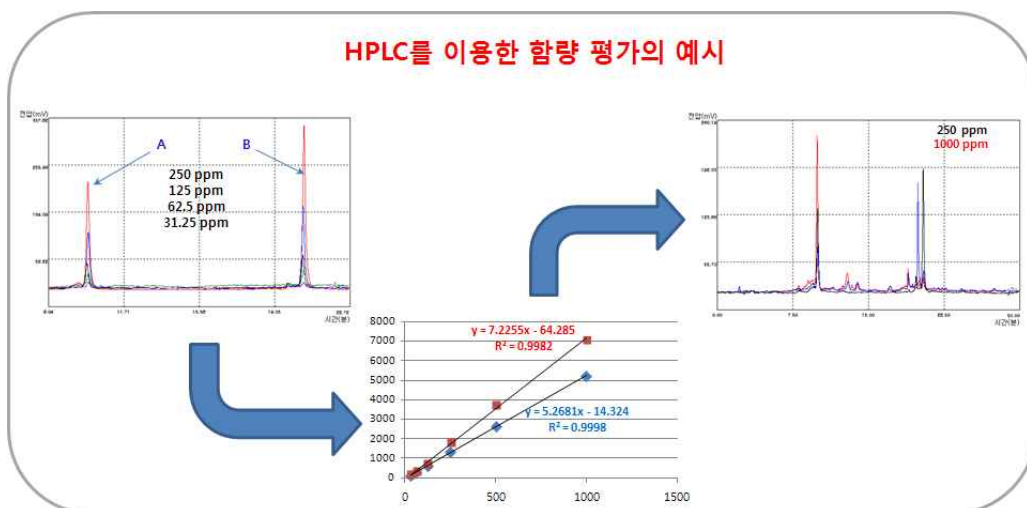
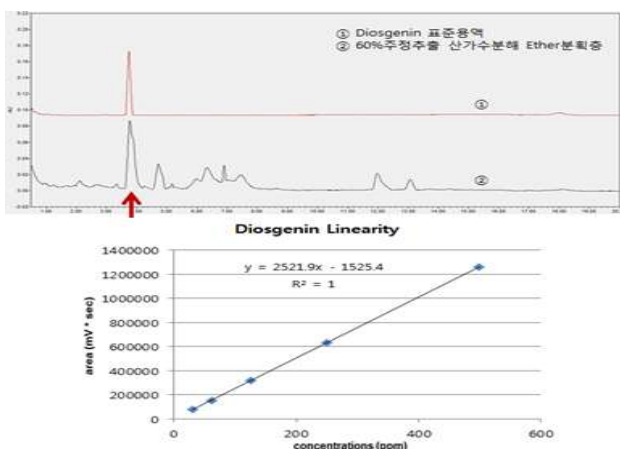


Fig 6. HPLC를 이용한 함량 평가의 예시

## (2) 분석법 validation

- 각 원료의 지표성분을 분석하는데 있어, 분석법의 타당성 확보
- 지표성분 확인 후, USP, AOAC 혹은 건강기능식품 공전 등 기존 공인분석법으로 가능한 지 여부 확인
- 식품의약품안전처에서 정하는, 건강기능식품 원료의 밸리데이션에서 5가지 기본 고려사항 실험을 통한 자체 분석법의 타당성 확보
- 분석법의 타당성을 평가하기 위해 『대한약전』 일반정보 중 ‘의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 지침’에 따라 validation을 실시한다. validation은 최소한 특이성 (specificity)과 정밀성(precision) 지표로서는 반복성(repeatability) 및 실험실내 정밀성 (intermediate precision)을 확보하도록 함
- 특이성: 불순물, 배합성분 등의 혼재 상태에서 분리대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력
- 정확성: 측정값이 이미 알고 있는 참값이나 표준값에 근접한 정도
- 정밀성: 균일한 검체로부터 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때 각각의 측정값들 사이의 근접성
- 정량한계: 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석 대상 물질의 최소량
- 직선성: 실험방법이 일정 범위에 있는 검체 중 분석대상물질 대하여 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력
- 범위: 적절한 정밀성, 정확성 및 직선성을 충분히 제시할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 하한값 및 상한값 사이의 영역
- 성분 프로파일 분석을 위한 특이성은 크로마토그램 상각 피크의 특징 UV, IR, Mass spectrum 등이 특이적으로 확보되는 것을 확인하는 정도로 가능함. HPLC 등에서는 다양한 원인에 의해서 피크 유지시간 변동(retention time shift)이 발생할수 있으며 이는 성분프로파일의 확인 및 평가에 영향을 미칠 수 있어, 반복성과 실험실내 정밀성은 크로마토그램상의 피크면적 뿐 아니라 피크 유지시간에 대해서도 validation이 수행되어야 함. 이때 각각의 항목에 대해 상대표준편차(RSD)는 5% 이하가 되도록 하는 것이 바람직하며, 필요한 경우 내부표준물질을 사용하여 정밀성을 확보할 수 있음



Compound	Conc. (µg/mL)	Accuracy (%)		Precision (c.v.,%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
(+)-catechin	250	99.87	99.66	0.17	0.92
	125	100.63	100.36	0.12	0.53
	62.5	99.63	99.79	0.21	0.49
	31.25	99.98	99.78	0.50	0.34
	15.625	98.55	98.07	0.35	1.13
Diosgenin	500	98.20	100.07	0.37	1.48
	250	98.82	99.94	1.12	0.09
	125	98.81	99.23	0.21	1.32
	62.5	99.89	101.06	1.26	1.10
	31.25	103.40	102.79	0.80	0.39

Compounds	Linear range (µg/mL)	Response Slope(a)	Response Factor(b)	Correlation Coefficient(R <sup>2</sup> )	LOQ (µg/mL)
(+)-catechin	15.625 ~ 250	20674	-23670	1	2.08
Diosgenin	31.25 ~ 500	2521.9	-1525.4	1	8.74

Fig 7. HPLC validation 항목(특이성, 직선성, 정확성 등)의 예시

### 3. 전구지방세포를 이용한 단일 및 복합 추출물의 cell-based assay 항비만 효과 검증 가. 세포독성 평가

- 전구지방세포 증식능은 96-well plate에 세포를 배양하면서 고추씨 추출물을 첨가하여 1일(24h) 후 각각 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide] assay를 이용하여 전구지방세포 증식능을 측정

### 나. 개별/복합 추출물의 지방 생성 억제 효과 및 시너지 평가

- 6-well plate 배양된 세포에 분화유도와 함께 고추씨 추출물을 첨가한 후 지방 생성량은 Oil Red O 염색법을 이용하여 추출물의 지방 생성 억제효과를 평가함. 분화유도가 끝난 세포는 PBS로 washing 하여 10% formalin으로 실온에서 30분간 고정시킨 후에 4% Oil Red O 용액으로 30분간 염색하여 현미경으로 지방의 염색정도를 평가하여 효능을 평가함. 지방은 Oil Red O 용액으로 염색하면 적색으로 염색됨

### 다. 지방생성 관련 전사인자 발현 억제효과

- 분화유도 실험이 종료된 3T3-L1 세포를 PBS 용액으로 1회 세척한 후 lysis buffer를 넣고 얼음 위에서 10분간 용해시킨 뒤 수거하여 원심분리(13,000 rpm, 4°C, 20min)하여 상층액을 회수함. 회수한 상층액은 Bradford reagent로 단백질을 정량한 후 10% SDS-polyacrylamide gel 전기영동 한 다음 nitrocellulose membrane에 transfer 함. 5% skim milk로 blocking 한 후 일차항체를 반응시킨 후 horseradish peroxidase가 포함된 이차항체로 반응시키고 ECL kit를 사용하여 표적 단백질을 확인함

### 라. Apoptosis 측정

- 세포사멸 정도 측정을 위하여 MuseTMAnnexin V & Dead Cell Kit를 이용하여 측정. 분화가 완료된 지방세포에 시료를 처리하고 24시간 후에 PBS로 세척 후 trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 수거하고 1400rpm, 5분 동안 원심분리 후 상층액을 제거하고 세포를 DMEM으로 재 부유 시킨 후 MuseTMAnnexinV & Dead Cell reagent (100µl)와 재부유 시킨 세포 100µl를 혼합하여 20분 동안 반응 시킨 후 Muse Cell Analyzer를 이용하여 측정함

## 4. 고지방 식이 유도 동물모델을 이용한 단일/복합 추출물의 in vivo 항비만 효과 검증

: Cell-base assay를 통해 선별된 추출물을 중심으로 *in vivo* 항비만 효과

### 가. 식이효율 및 체중억제효과

- 중앙 실험동물에서 5주령 수컷의 C57BL/6J를 공급받아 실험에 사용. 식이는 AIN-93G를 기본으로 60kcal fat이 들어간 식이를 pellet 형태로 공급하고, 대조군(control)과 추출물을 먹인 실험군으로 나누어 사육함. 추출물 투여량은 6주 동안 매일 경구투여하며 식이와 물은 매일 신선한 것으로 공급함. 동물을 사육하는 동안 매주 체중을 측정하고 먹이 섭취량을 측정함. 먹이 섭취량은 전날 공급분에서 남은 양을 빼는 방법으로 계산

**나. 체지방 저하효과**

- 복부 총지방량은 실험이 종료된 후, 실험동물의 복부를 절개하여 부고환 주위의 지방과 후복부의 지방을 모두 절제하여 무게를 측정

**다. 혈중지질 억제효과**

- 동물을 희생시킨 후 실험동물의 복부 대동맥으로부터 혈액을 분리한 다음에 원심분리기를 이용하여 혈청을 분리함 혈청중의 총콜레스테롤과 중성지방은 영동제약의 kit를 이용하여 측정

**라. 인슐린 저항성 억제 효과**

- 인슐린 저항성을 평가하기 위하여 HOMA-IR를 구하여 평가함

$$HOMA-IR = \frac{\text{Fasting insulin}(mIU/L) * \text{fasting glucose}(mmol/L)}{22.5}$$

**마. 고지방식이 유도 비만 동물모델에서 항비만 기작 규명**

- 동물 조직을 lysis buffer를 넣고 얼음 위에서 homogenization 한 뒤 수거하여 원심분리(13000 rpm, 4°C, 20min)하여 상층액만을 회수함. 회수한 상층액은 Bradford reagent(BioRad, Hercules, CA)로 단백질을 정량한 후 10% SDS- polyacrylamide gel 전기영동 한 다음 nitrocellulose membrane에 transfer 함. 5% skim milk로 blocking 한 후 일차항체(를 반응시킨 후 horseradish peroxidase가 포함된 이차항체로 반응시키고 ECL kit를 사용하여 표적 단백질을 확인

**5. 고추씨 추출물, 파인엑스를 이용한 단일/복합 기능성 소재의 대사질환 개선 능력 검증 연구**

Table 2. 단일/복합 기능성 소재에 의한 인슐린 저항성, 고지혈증, 지방간 평가 동물실험 계획

Groups	대조군	기능성 소재		
		고추씨	파인엑스	복합소재
% kcal from fat	11.7	11.7	11.7	11.7
Functional ingredient (µg/mL)	0	100	100	100
Number of animal	12	12	12	12
Sex	male	male	male	male
Feeding period (week)	8	8	8	8

**가. 동물 실험**

- 유전적 당뇨병 실험 모델로 선발된 db/db 쥐(mice)는 12시간 주기로 낮과 밤의 조건에 노출될 것이며, 6-8주령 수컷 동물들을 선별하여 1. 대조군 2. 고추씨 추출물, 3. 적송 껍질



추출물(파인엑셀), 4. 복합소재로 나누어 각 12마리씩 배정할 계획임. 모든 동물들은 인슐린 저항성, 고지혈증, 비알코올성 지방간 등의 표현형이 나타나는 약 8주간 자유급식과 자유음수 환경에 놓이게 될 예정임. 인슐린 저항성과 고지혈증 확인을 위해 동물에게 전야급식이 실시될 예정이며, 채혈과 장기적출 과정 등에 사용될 예정임. 비알코올성 지방간의 발병 확인을 위해 12주 이상의 쥐의 간을 채취하여 Oil-Red-O/Nile red 염색 및 염증반응을 측정하여 표현형의 발현여부 및 환원여부를 확정지음. 혈장 내 당질, 지질 분석을 통해 대사질환 여부를 판단한 동물들은 이후 장기적출을 위해 사용될 예정임. 간, 등 근육, 다리 근육, 신장, 뇌, 내장지방, 피하지방 등을 분리하여 mRNA와 immunoblotting 실험에 사용될 때까지 -80° C에 저장할 예정임. 동물과 관련한 일체 연구는 국민대학교 및 식품안전처 동물연구윤리위원회의 승인 후 적법한 과정을 준수하여 진행될 예정임

### 나. 사료 섭취량 및 체중의 측정

- 매주 일정한 시간에 식이와 수분을 공급하여 그 급여량과 잔여량의 차이로부터 식이섭취량을 측정함. 체중은 실험식이 공급 시작일을 0 day로 하여 희생 전까지 매주 일정한 날에 변화를 측정함

### 다. 체성분 분석

- DXA(Dual energy X-ray Absorptiometry)를 이용하여 체중, 체지방 함량, 근육량, 골밀도 등의 체성분을 피과파괴적이면서 반복 가능한 방법으로 측정함. 이를 위해 격주로 실험 동물을 복강 주사 마취하고 디지털 엑스레이 장치로 측정을 실시함

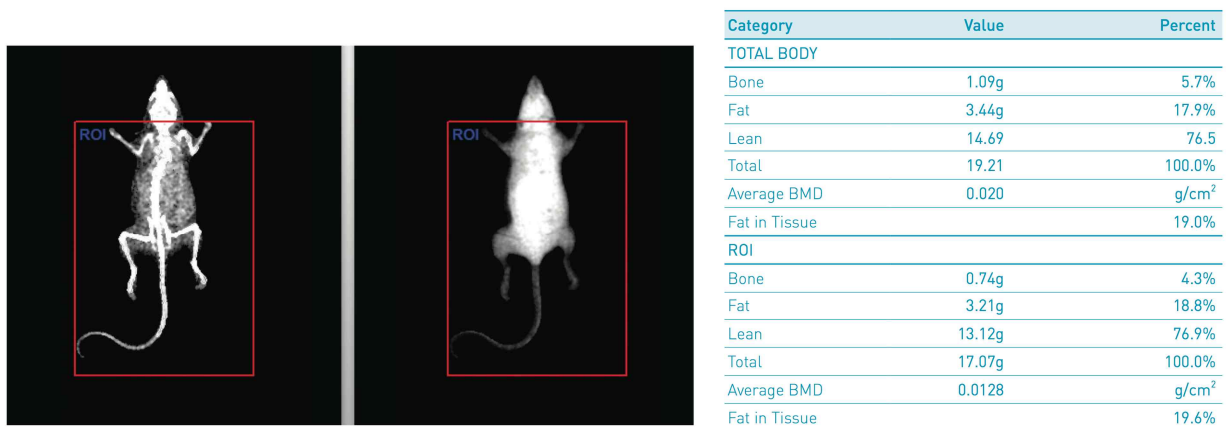


Fig 8. 쥐의 DEXA scan 사진 및 분석표 (예시)

### 라. 혈당 및 당화헤모글로빈 (HbA1c) 농도 측정

- 기능성 소재 급여 0, 2, 4, 6, 8주째 실험동물을 12시간 절식시킨 후, 꼬리 정맥에서 채혈하여 Glucometer를 사용하여 glucose-oxidation 방법에 근거한 전기화학적 방법으로 공복 시 혈당을 측정함. 당화헤모글로빈 농도(HbA1c)는 실험식이 급여 6주째 실험동물을 12시간 절식시킨 후, 꼬리 정맥에서 채혈하여 reflectometry을 이용한 Nycocard reader II를 사용하여 측정함

#### 마. 중성지질(TG)과 콜레스테롤 함량 확인

- 동물에서 채취한 간, 근육, 신장, 근육 조직과 배양 후 거둔 세포를 대상으로 5% NP-40 버퍼를 이용해 추출한 세포 내 중성 지질과 콜레스테롤은 원심분리를 거쳐 Wako TG, cholesterol kit를 이용해 ELISA로 측정함

#### 바. 경구 내당능 검사 (Oral glucose tolerance test; OGTT)

- 실험동물을 12시간 절식시켜 꼬리 정맥에서 채혈하여 공복 시 혈당을 측정한 후, 50% glucose 용액 (0.1 g glucose/100 g B.W)을 경구 투여하고 30분, 60분, 120분 후 혈당을 측정함

#### 사. 복강 내 당부하 검사(intraperitoneal glucose tolerance test; IPGTT)

- 12시간 금식 후 2 mg/kg의 포도당을 복강 내로 투여 후 0, 15, 30, 60, 90, 120분 단위로 꼬리에서 혈액을 채취하여 혈당을 측정함. 0분에는 인슐린/글루카곤 농도 측정을 위해 안와총 채혈을 진행함

#### 아. 세포 배양

- HepG2, C2C12 등 질병 모델을 재현할 다양한 세포를 선별하여 들은 Dulbecco' s modified Eagle' s medium (DMEM)에 10 % fetal bovine serum 와 1x의 penicillin-streptomycin 으로 배양하고, O2/CO2 (19:1)의 조성으로 이뤄진 37 °C 세포배양기에서 배양한다. 세포는 confluency가 70~80% 정도 차면 0.25 % trypsin in EDTA solution으로 2~3일에 한번씩 계대함

#### 자. 항체와 primer 선정

- 단일/복합 기능성 소재에 의한 대사질환 관련 신호전달 체계 변화를 확인하기 위해 다음과 같은 다양한 항체를 활용할 예정임; ACC1-pS79, ACC1, FASN, SCD1, TBP, GAPDH, IR, IRS1, IRS1-p, AKT- pS473, AKT, GSK3b-pS21/9, GSK3b, TSC2-pT1462, TSC2, mTOR-pS2448, mTOR, S6K-pT389, S6K, S6-pS240/244, S6, 4E-BP1-pS65, 4E-BP1, LRP6-pS1490, LRP6, TCF7L2, b-catenin, b-catenin-pS33/37/T41, AKT-pT308, apoB, SCAP, Insig1, Insig2, Sp5, Sp1, MTP, SREBP1, SREBP2, Lamin B, tubulin, b-actin

#### 차. mRNA 발현 확인을 위한 qRT-PCR

- 전체 RNA는 세포로부터 RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen Sciences)를 사용하여 분리하고, complementary DNA(cDNA)는 SuperscriptsII reverse transcriptase kit를 통해 합성함. Realtime PCR의 실시간 증폭은 타겟 primer와 iQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection system(Bio-Rad)를 이용해 실시한다. 결과는 18S internal control에 대비한 mRNA양을 계산(delta delata Ct value)해 사용함

## 카. Western Blot/immunoblotting

- 기능성 소재에 의한 대사질환 관련인자 변화를 관찰하고 세부 기전을 파악하기 위해 인체시료, 동물조직, 세포단백질은 protease와 phosphatase 저해제가 들어있는 세포용해 RIPA buffer로 세포를 용해시켜 세포용해물(cell lysate)을 만듦. 단백질농도를 측정 후 추출된 단백질은 2x Laemmli sample loading buffer에 녹임. Bio-Rad의 mini-gel system으로 SDS-polyacrylamide gel 전기영동을 진행하고(running), electro blot system을 통해 총단백질을 PVDF membrane으로 옮긴다(transfer). 옮겨진 단백질은 타겟 1차항체와 HRP-conjugated 2차 항체를 이용하여 immunoblot함. 화학 발광시약을 적용하여 Bio-Rad ImageLab software로 단백질의 양을 정량함. 이를 통해 당뇨병, 고지혈증, 비알코올성 지방간이 형성된 동물들의 경우 de novo lipogenesis, 지방산 조성 변화, 중성지방 합성, 콜레스테롤 합성, 지단백질 합성, 인슐린 저항성 등에서 여러 변화를 수반함. 이러한 변화를 일으키는 주요 변화 중 하나는 전사조절 요소인 SREBP1/2 및 ChREBP의 변화가 일반적이는데, 이러한 변화는 LRP6-IGF1-Spl-mTOR와 관련 깊은 기작이므로 이들의 관련 여부를 조사함. 이를 위해 1-2년차 연구 결과 특정지어진 전사조절인자 및 단백질의 shRNA, transfectional over-expression, adenovirus/lentivirus를 이용한 in vitro/in vivo rescue 연구를 진행함

## 타. 지방분해효소 LPL의 억제제인 P-407 주사를 통한 인슐린 내성에 의한 중성지방 합성능력 평가

- 간에서 새롭게 합성하는 중성지방의 양을 측정하기 위해 각 그룹의 동물들은 6시간 공복기를 거친 후 P-407 (1,000 mg/kg 체중)을 주사받은 뒤 0, 1, 2, 6, 24시간에 걸쳐 채혈을 실시. 분리된 혈장 내 지방의 함량은 효소활성을 활용한 진단 키트로 측정함

## 6. 인체적용시험을 통한 기능성 구명

### 가. 인체적용시험 디자인

- 전문 CRO 확보: 이화여대, 아주대, 전북대 등 몇몇 임상시험센터 후보
- 인체적용시험 디자인 구상
  - : 각 질환 별 선정대상과 제외대상 기준 확립
  - : 동물실험을 바탕으로, 일일섭취량 설정 및 시험기간 설정
  - : 단일 혹은 복합 원료 결정
  - : 무작위 위약대조, 이중맹검법 시험(Randomized, placebo controlled, double blind)
- 인체적용시험 대상자 선정
  - : 그룹 당 40명씩 총80명의 남녀 선정
  - : BMI 지수 26~30 사이 대상자를 콜레스테롤, 혈당, 중성지방이 높은군과 낮은 군 선정
  - : 본 원료 섭취에 따른, 체지방, 몸무게, 대사성 지표(콜레스테롤, 혈당, 중성지방, LDL)등의 지표 감소 확인
  - : 약 12~16주 시험





Fig 11. 노바렉스의 국내외 네트워크

- 국내외 많은 유통사와 네트워크를 가지고 있으므로 거래 채널을 통해 개발된 원료의 프로모션, 소개가 가능하며 해당 원료를 사용하여 제품까지 지원하는 OEM/ODM도 하고 있기 때문에 판매에 유리함

### 제 3 절 연구개발 추진 일정 및 결과 요약

#### 1. 1차년도 (2015. 10. 23 ~ 2016. 10. 22)

##### 가. 연구 목표 및 연구 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
	1세부: 국내 농산물 인 고추씨와 소나무껍질 추출물을 이 용한 체지방 감소 기능성 식품의 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 원료의 표준화</li> <li>- 원료의 지표성분 확립</li> <li>- 지표성분 분석법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 추출공정법 확립</li> <li>- 지표성분 분석 및 선정</li> <li>- 지표성분 분석법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 고추씨 추출공정 확 립: 분무건조(SD: spray dry)</li> <li>▶ 고추씨, 파인엑솔 지 표물질 선정 및 분석 법 밸리데이션</li> <li>- 파인엑솔: procyanidin, Taxifolin 두 가지 설정 및 밸리데이션법 확립</li> <li>- 고추씨 : Icariside E5 설정 및 밸리데이션법 확립 진행 중</li> </ul>
1차 년도 (2015)	제1 협동: 개별 및 복합 소재의 식이성 비만 억제를 통한 체지방 감소 효과 검 증 및 기작규 명	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 개별 및 복합 추출물 의 cell-based assay 항 비만 효과 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 개별 추출물의 항비만 효과 검증</li> <li>- 복합 추출물의 항비만 효과 검증</li> <li>- 체중 및 체지방 감소 효과</li> <li>- 식이효율 감소효과</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 개별 추출물의 항비 만 효과 검증</li> <li>- 고추씨 추출물(추출 온도 및 건조 방법) 항비만 효과 검증 완 료.</li> <li>- 파인엑솔(농축액 제조 방법별) 항비만 효과 검증 완료.</li> <li>- 파인엑솔(처리시간 별) 항비만 효과 검증 진행중 (기존 8일→1, 2, 3일)</li> <li>▶ 복합 추출물의 항비 만 효과 검증</li> <li>- 복합 비율에 따른 항 비만 효과 검증 완료</li> <li>- 처리시간에 따른 복 합 추출물의 항비만 효과 검증 진행 중</li> </ul>

		<p>동물모델 이용한 단일 및 복합 추출물의 <i>in vivo</i> 항비만 효과 검증</p> <p>▶ 인체적용 dose 결정</p>	<p>- 인슐린저항성 억제효과</p> <p>- 지질대사 이상 억제 효과</p> <p>- 동물모델 결과를 토대로 인체적용 dose 결정</p>	<p>▶ 개별 및 복합 추출물의 항비만 효과 검증 진행 중(08.11 기준-4주)</p> <p>- 4주 동안의 체중을 측정한 결과, 전체 실험군에서 현재까지 유의적인 차이가 나타나지 않음[(정상식이대조군, 고지방식이대조군, 고추씨 추출물(100, 200, 400mg/kg B. W.)과 파인엑솔(30, 50mg/kg B. W.) 투여군, 복합 추출물(복합1: 파인엑솔 50+고추씨 추출물 100mg/kg B. W., 복합2: 파인엑솔 50+고추씨 추출물 200mg/kg B. W.))</p> <p>- 동물실험 논문 게재 준비 중</p>
<p>제 2협동: 렙틴 저항성 비만 모델을 이용한 개별 및 복합 기능성 소재의 항비만 및 인슐린 내성 개선 연구</p>	<p>▶ 근육세포와 간세포를 이용하여 인슐린 저항성 개선 효과 검증</p>	<p>- 근육세포인 C2C12와 간세포인 AML12에서 개별 및 복합 기능성 소재의 인슐린 내성 개선 효과 검증</p>	<p>▶ 개별 및 복합 소재의 세포 독성 실험을 통해 적정 농도를 설정함. C2C12와 AML12에서 적송겉질 추출물은 50, 100, 150 µg/mL 농도에서, 고추씨추출물은 50, 100, 150, 200 µg/mL 농도에서 독성을 나타내지 않음. 또한 혼합물 형태에서도 독성을 가지지 않음을 확인</p> <p>▶ C2C12에서 포도당 흡</p>	

		<p>▶ 간세포를 통해 지질생합성 억제 효과 검증</p>	<p>- 간세포인 HepG2에서 적송겹질 추출물 처리에 의한 지질생합성 억제 효과 측정</p>	<p>수 관련 단백질인 GLUT4의 발현을 측정해본 결과, 적송겹질 추출물 150 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> 농도에서 유의적으로 증가함. 혼합물에서는 효과가 없었음</p> <p>▶ AML12에서 포도당신생합성량을 측정해본 결과, 고추씨 추출물 50, 100, 150 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> 농도에서 낮은 경향을 보임</p> <p>▶ HepG2에서 적송겹질 추출물은 50, 100, 150 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> 농도에서 독성을 나타내지 않음</p> <p>▶ HepG2에 적송겹질 추출물을 처리한 결과, 150 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> 농도에서 대조군에 비해 중성지질이 유의적으로 줄어들었으며, 100, 150 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> 농도에서 콜레스테롤양이 유의적으로 줄어듦</p>
--	--	---------------------------------	--	---



## 나. 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>&lt;제 1세부&gt;</p> <p>▶추출 공정 확립</p> <p>▶지표성분 분석 및 분석법 확립</p>	<p>▶추출방법 결정</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 고추씨: 동결건조(FD), 분무건조(SD) 두가지로 추출진행</li> <li>- 파인엑솔: 열수추출로 기공정 셋팅</li> </ul> <p>▶TLC와 HPLC를 이용한 각 원료 내 지표성분 분석 및 분석법 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 파인엑솔의 지표물질 분석</li> <li>- 고추씨에서 지표물질 분석</li> <li>- 분석법의 타당성 측정</li> </ul>	<p>▶FD와 SD로 추출한 원료를 세포독성 및 지질축적억제 시험</p> <p>▶두 방법에 차이가 없어 제품화에 유리한 SD법으로 선정</p> <p>▶TLC로 원료 내 성분 분포 확인</p> <p>▶파인엑솔에서 Taxifolin, (+)-catechin, procyanidin 세 가지 성분 분석</p> <p>▶고추씨의 경우, Icariside E5</p> <p>▶HPLC를 이용하여 분석한 방법이 맞는지 분석법의 밸리데이션 진행</p>
<p>&lt;제 1협동&gt;</p> <p>▶개별 및 복합 추출물의 in vitro/ in vivo를 이용한 항비만 효과 검증</p>	<p>▶개별 및 복합 추출물의 cell-based assay 항비만 효과 검증 (3T3-L1 cell)</p> <p>▶고지방식이 유도 비만 동물모델 이용한 개별 및 복합 추출물의 in vivo 항비만 효과 검증</p> <p>▶인체적용 dose 결정</p>	<p>▶세포독성 평가</p> <p>▶개별 추출물의 지방생성 억제 효과 평가 및 복합추출물의 지방생성 억제 시너지 평가</p> <p>▶체중 및 체지방 감소 효과</p> <p>▶식이효율 감소효과</p> <p>▶인슐린 저항성 억제효과</p> <p>▶지질대사 이상 억제 효과</p> <p>▶동물모델 결과를 토대로 인체 적용 dose 결정</p>
<p>&lt;제 2협동&gt;</p> <p>▶개별 및 복합 기능성 소재의 적정 농도 설정</p>	<p>▶기능성 소재는 세포에 독성을 나타내지 않으면서 기능성을 가져야 함. 이에 따라 적정 농도 설정</p>	<p>▶실험에 이용된 HepG2와 AML12 (간세포), C1C12 (근육세포)에 고추씨와 적송껍질 개</p>

<p>▶ 근육세포의 인슐린 내성 개선 효과 검증</p>	<p>정을 위해서 세포 독성 실험을 진행함. MTT로 살아있는 세포를 염색하여 세포 생존율을 비교함</p> <p>▶ 인슐린은 근육세포의 포도당 흡수를 조절함. 인슐린에 내성을 가지게 되면 근육세포의 포도당 흡수 능력이 저하됨. 이에 따라 근육세포 내 포도당 흡수 관련 단백질 발현을 측정함</p>	<p>별 및 복합 소재를 각각 농도별로 처리하여 독성을 나타내지 않는 적정 농도를 설정함</p> <p>▶ 근육세포인 C2C12에 고추씨와 적송껍질 추출물을 처리한 후 western blotting으로 세포 내 GLUT4 (glucose transporter 4) 단백질의 발현을 측정함</p>
<p>▶ 포도당신생합성 억제 효과 검증</p>	<p>▶ 간에서는 포도당신생합성을 통해 혈당을 높임. 인슐린은 포도당신생합성을 조절하여 혈당을 조절함. 특정 조건에서 간세포가 생성해내는 포도당 양을 측정하여 포도당신생합성 억제 효과를 검증함</p>	<p>▶ 간세포인 AML12에 고추씨와 적송껍질 추출물을 처리한 후 세포가 포도당신생합성을 할 수 있는 조건을 만들어줌. 일정 시간 후 간세포가 생성해낸 포도당을 정량함</p>
<p>▶ 간세포의 지질생합성 억제 효과</p>	<p>▶ 간세포의 지질생합성은 세포 내 중성지방 및 콜레스테롤을 측정하여 정량할 수 있음</p>	<p>▶ 간세포인 HepG2에 적송껍질 추출물을 처리한 후 세포 내 지질을 추출하여 중성지방 및 콜레스테롤량 변화를 측정함</p>

## 2. 2차년도 (2016. 10. 23 ~ 2017. 10. 22)

### 가. 연구 목표 및 연구 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
2차 년도 (2016)	제 1세부: 국내 농산물인 고추씨와 소나무껍질 추출물을 이용한 체지방감소 기능성식품 의 개발	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 원료의 대량추출</li> <li>- 인체적용시험을 위한 표준화된 원료 대량추출</li> <li>- 인체적용시험용 제형 개발</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Scale up 수준의 생산공정 기반 확립</li> <li>- 제형 안정성 검토</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 고추씨 원물 200kg 파일럿 생산 및 1톤 대량생산</li> <li>- 원료자체에서 유해물질 분석 및 음성나옴</li> <li>- 제형의 경우, 시험식품 생산 후, 0, 1, 3, 6개월 간격으로 유해물질 및 지표물질 변화 측정예정</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 고추씨 추출물에서 지표물질 선정 및 분석법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 지표물질 선정 및 분석법 밸리데이션</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Icariside E<sub>5</sub> 및 Vanilloylicarside E<sub>5</sub>를 선정함</li> <li>- HPLC법을 밸리데이션 함</li> </ul>
		<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 인체적용시험을 위한 시험법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- CRT 기관 선정 및 시험법 확인</li> <li>- IRB 통과 및 시험 참가자 선정</li> <li>- 시험 디자인</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 수원 성빈센트병원 선정</li> <li>- 9월에 IRB 통과 및 시험자 모집 시작</li> <li>- DBP, RCT, 단일기관 및 12주 섭취. 대조군, 시험군 1(고추씨 섭취군), 시험군 2(고추씨/파인엑솔 복합물 섭취군)</li> <li>- 체지방률, BMI, WHR, 허리둘레, 혈액학적 마커(TG, TC 등)</li> </ul>
	제 1협동: 개별 및 복합	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 개별 및 복합 추출물의 cell-based</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 지방세포 분화 및 생성에 관여하는</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 고추씨 추출물의 항비만 기작 구명</li> </ul>

소재의 식이성 비만 억제를 통한 체지방 감소 효과 검증 및 기작규명	assay 항비만 기작 규명	유전자발현 검증	완료 - FAS, p-ACC, ACC, FABP4
		- 에너지 대사 조절에 관여하는 유전자 발현 검증	▶ 고추씨 추출물의 항비만 기작 규명 완료 - AMPK signaling 규명 [AMPK inhibitor(compound C)이용]
	▶ 고지방식이 유도 비만 동물모델 이용한 항비만 기작 규명	- 지질대사 이상 및 인슐린저항성 억제효과	▶ 고추씨 추출물의 지질대사 이상 억제 효과 검증 완료 - 고추씨 200 mg/kg 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 TG, TC, HOMA-IR이 유의적으로 감소함. ▶ 파인엑솔과 복합군은 효과 없음
		- 지방세포 분화 및 지방생성에 관여하는 유전자 발현 검증	▶ 지방조직에서 고추씨 추출물의 단백질 발현 검증 완료 - PPAR- $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , SREBP-1c - FAS, FABP4 ▶ 파인엑솔과 복합군은 효과 없음 ▶ 간조직에서 고추씨 추출물의 단백질 발현 검증 완료 - SREBP-1c, SREBP-2 - FAS, FABP4, p-ACC
		- 에너지 대사 조절에 관여하는 유전자 발현 검증	▶ 지방조직에서 고추씨 추출물의 단백질 발현 검증 완료 - AMPK, p-AMPK, ACC ▶ 파인엑솔과 복합군은 효과 없음 ▶ 간조직에서 고추씨

				추출물의 단백질 발현 검증 완료 - AMPK, p-AMPK
제 2협동: 렙틴저항성 비만모델을 이용한 개별 및 복합 기능성 소재의 항비만 및 인슐린 내성 개선 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 인슐린 저항성으로 인해 비만한 동물에게 파인엑솔, 고추씨 추출물, 복합물을 투여하여 체지방 감소 검증</li> <li>▶ 인슐린 저항성으로 인해 비만한 동물에게 파인엑솔, 고추씨 추출물, 복합물을 투여하여 혈당 감소 및 인슐린 저항성 개선 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 체중 및 체성분 분석</li> <li>▶ 간 독성 지표 분석</li> <li>▶ 공복 혈장 혈당, 공복 혈장 인슐린, 혈장 당화혈색소 분석</li> <li>▶ 경구 내당능 (OGTT) 분석</li> <li>▶ 간의 포도당신생합성 기전 분석</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 시험물질에 의한 체중, 사료 섭취량, 체지방량, 제지방량 영향 없음.</li> <li>▶ 단일 및 복합물의 섭취는 체지방 감소 효과 없음.</li> <li>▶ 단일 및 복합물 투여로 인한 간 독성 없음</li> <li>▶ 고추씨 200 mg/kg과 1:2 복합물에서 공복 혈장 혈당, 혈장 당화혈색소 및 혈장 인슐린 농도가 유의적으로 감소함.</li> <li>▶ 모든 실험군이 동일한 혈당 증가율을 나타냄. 고추씨 200 mg/kg과 1:2 복합물의 혈당 개선 효과는 인슐린 민감도 개선이 아닌 간의 당신생합성율을 조절 표현형을 확인함</li> <li>▶ 고추씨 200 mg/kg과 1:2 복합물에서 AMPK와 FoxO1의 인산화가 증가함</li> <li>▶ 고추씨 200 mg/kg과 1:2 복합물에서 당신생합성과정에</li> </ul>	

			<p>직접적으로 기여하는 G6Pase와 PEPCK의 발현량이 유의적으로 감소함</p> <p>▶ 고추씨 200 mg/kg과 1:2 복합물에서 당신생합성의 감소를 통한 간의 포도당 합성억제를 확인함</p> <p>▶ 이상지질혈증 분석</p> <p>▶ 혈중 중성지질(TG)은 1:2와 1:4 복합물에서 유의적으로 감소함</p> <p>▶ 혈중 유리지방산(FFA)은 1:2 복합물에서 유의적으로 감소함</p> <p>▶ 혈중 염증인자 분석</p> <p>▶ TNF-<math>\alpha</math>는 고추씨 200 mg/kg과 1:2 복합물에서 유의적으로 감소함</p> <p>▶ IL-6는 1:2 복합물에서 유의적으로 감소함</p>
--	--	--	--

## 나. 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>&lt;제 1세부&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 대량추출법 확립</li> <li>▶ 인체적용시험 시작</li>   <li>▶ 지표물질 선정 및 분석법 확립</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 물 환류 추출</li>   <li>▶ CRO를 통한 시험기관 선정 및 분석법, 바이오마커 등의 선정</li>   <li>▶ 고추씨 추출물에서 지표물질 선정 및 분석법 밸리데이션</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 200kg 시 추출 후, 1톤의 고추씨로 대량 물추출               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 30% 텍스트린, 4%의 수율</li> </ul> </li> <li>▶ CRO(네오뉴트라)를 통하여 시험기관 선정(수원 성빈센트병원) 및 12주, 단일기관, DBP, RCT 시험 및 체지방률, BMI, WHR, 혈액학적 마커선정(렙틴, 아디포넥틴 포함)</li> <li>▶ Icariside E<sub>5</sub>, Vanilloylcariside E<sub>5</sub> 2종 선정               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 논문게재 완료</li> </ul> </li> <li>▶ HPLC법 확립 및 밸리데이션 수행 완료</li> </ul>
<p>&lt;제 1협동&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 개별 및 복합 추출물의 in vitro/ in vivo를 이용한 항비만 효과 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 개별 및 복합 추출물의 cell-based assay 항비만 기작 규명</li>   <li>▶ 고지방식이 유도 비만 동물모델 이용한 항비만 기작 규명</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 지방세포 분화 및 생성에 관여하는 유전자발현 검증</li> <li>▶ 에너지 대사 조절에 관여하는 유전자 발현 검증</li> <li>▶ 지질대사 이상 및 인슐린저항성 억제효과</li> <li>▶ 지방세포 분화 및 생성에 관여하는 유전자발현 검증</li> <li>▶ 에너지 대사 조절에 관여하는 유전자 발현 검증</li> </ul>
<p>&lt;제 2협동&gt;</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 개별 및 복합 추출물의 in vivo를 통한 제 2형 당뇨 및 혈당 개선 효과 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 제 2형 당뇨병 유발 마우스 모델을 이용한 파인엑솔, 고추씨 추출물, 복합물의 항비만 및 체지방 감소 검증</li> <li>▶ 제 2형 당뇨병 유발 마우스 모델을 이용한 파인엑솔, 고추씨 추출물, 복합물의 혈당 감소 및 인슐린 저항성 개선 검증</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 체중 및 체성분 분석</li> <li>▶ 사료섭취량 분석</li> <li>▶ 간 독성 분석</li> <li>▶ 공복 혈장 혈당, 공복 혈장 인슐린, 혈장 당화혈색소 분석</li> <li>▶ 구강 내당능 검사(OGTT) 분석</li> <li>▶ 간의 포도당신생합성 관련 단백질 탐색 및 변화 분석</li> <li>▶ 이상지질혈증 마커 분석</li> <li>▶ 혈중 염증인자 분석</li> </ul>

### 3. 3차년도 (2017. 10. 23 ~ 2019. 04. 22)

#### 가. 연구 목표 및 연구 결과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
3차 년도 (2017)	1세부: 국내 농산물 인 고추씨와 소나무껍질 추출물을 이 용한 체지방 감소 기능성 식품의 개발	▶ 원료의 추출 표준화 확립 - 균질한 원료의 대량생산법 확보	▶ 원료의 추출 표준화 확립 - 산지별 고추씨 구매 및 원료 동등성 확인  - 시료 반복 대량 추출	- 괴산, 안동, 영월, 해남지역의 고추씨 구매 및 추출 진행 - 성상이 다른 괴산지역을 제외한 4개 지역(안동, 영월, 해남, 영양) 고추씨 추출물의 HPLC 패턴분석 결과 주요 peak의 위치 및 패턴이 비슷함을 확인 - 50 kg 씩 3번 반복 추출 진행, 평균 수율 6.97%로(30% 텍스트린 포함) 제조됨
		▶ 인체적용시험 수행 - 인체적용시험 완료 및 결과 분석 완료	▶ 인체적용시험 수행 - 인체적용시험 수행 및 모니터링  - 데이터 정리 및 유효성&안전성 통계 분석	- 126명 screening, 120명 randomization 등록, 23명 drop out, 총 97명 시험완료 (2019. 1. 30) - 녹십자랩셀 원외 분 석 완료(19. 2. 14) - DEXA, CT 원내 분석 완료(19. 2. 18) - 유효성 분석 완료 - 안전성 분석 완료 - 최종보고서 (ver 1.0)
		▶ 개별인정 등록 신청	▶ 개별인정 등록 신청 - 기능성원료 인정 신청서(개별인정신청 서) 작성 및 접수	- 기능성원료 인정 신청서 및 제반자료 정리(DB, 문헌검색 등) - 원료의 특성 및 유해물질 공인분석 - 지표물질 분석 컬럼, 표준품, 시료 및 개별인정원료 인정 신청서 식약처 제출
		▶ 제품화 방안 모색	▶ 제품화 방안 모색	- 인체적용시험 결과



		- 일반식품 가능 및 개별인정 후 판매를 위한 관련 업체에 원료 프로모션 진행	- 제형검토&시제품 제작 및 일반식품 품목제조신고 - 고객사 및 박람회 원료 소개	확립 후, 우선 동물실험 결과로 식품 및 건강기능식품 부원료로 사용 계획임
--	--	---	--	---

### 나. 연구범위 및 연구수행 방법

연구범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>&lt;제 1세부&gt;</p> <p>▶ 원료 추출 표준화 확립</p> <p>▶ 인체적용시험 수행</p> <p>▶ 개별인정형 원료 등록 신청</p> <p>▶ 제품화방안 모색</p>	<p>▶ 산지별 고추씨 구매 및 추출물의 HPLC 동등성 확인</p> <p>▶ 시료 반복 추출</p> <p>▶ 인체적용시험 수행 및 모니터링</p> <p>▶ 인체적용시험 결과 데이터 입력 및 SAS program 통계분석</p> <p>▶ 기능성 원료 인정 신청서 작성</p> <p>▶ 제형검토</p> <p>▶ 시제품제작 및 품목제조신고</p> <p>▶ 고객사 프로모션 및 박람회 참석</p>	<p>▶ 홍고추 산지별 고추씨 구매</p> <p>- 추출물 확보</p> <p>- 산지별 추출물의 HPLC 크로마토그램 패턴분석</p> <p>▶ 3 반복 추출, 제조공정 표준화</p> <p>▶ CRO기관 26회 모니터링 진행</p> <p>120명 인체적용시험 수행완료 (23명 중도탈락, 97명 시험완료)</p> <p>▶ 통계분석</p> <p>- Safety set 분석</p> <p>- FAS(Full analysis set) 분석</p> <p>- PPS(Per protocol set) 분석</p> <p>- ANCOVA(기저특성고려) 분석</p> <p>▶ 지표/유해물질 공인분석성적발급</p> <p>▶ 개별인정신청서 접수(온/오프)</p> <p>▶ 정제/캡슐/젤리 등 제형검토 및 선호도평가</p> <p>▶ 시제품(정제) 제작, 일반식품으로 품목제조신고(2건)</p> <p>▶ 국내외 박람회에 원료소개 및 고객사에 개발원료(고추씨/파인엑솔 외 다수) 소개</p>

## 제 4 절 원료의 표준화

### 1. 원물 수급선 확보 및 산지별 동등성 확인

#### 가. 원물 수급 및 재배지 확인

##### (1) 고추 및 건고추 판매지 확보 및 원물 수급선 확보

- 균질한 고추씨 확보를 위하여, 연간 수확량, 안전성 관리, 품종관리를 체계적으로 하는 지역 중, 영양군을 선택하였고, 체계적인 관리를 통해 균일한 품질의 고추를 재배하는 영양고추유통공사의 “빛깔찬” 브랜드의 고추씨를 선택하여 원재료로서 사용하였음

##### (2) 국내산 적송껍질 추출물 판매처 확보

- 국내산 적송껍질 추출물(파인엑솔)의 경우, (주)뉴트라팜에서 이미 대량생산 공정을 확보한 상태이며, 일반식품으로 제품화하고 있는 소재로 파인엑솔의 경우 (주)뉴트라팜으로부터 제공 및 구매하기로 함



Fig 12. 파인엑솔의 활용범위 및 파트너사

#### 나. 산지별 고추씨 추출물의 동등성 확인

##### (1) 산지별 고추씨 구매

- 농산물 등 천연물 원료는 재배되는 토양, 수확시기, 재배환경 등에 영향을 받을 수 있으므로 산지별 원물의 수급 및 동등성을 확인할 필요가 있다고 판단되어 추가 연구를 진행함
- 표준화 및 대량생산에 완료된 파인엑솔(적송껍질 추출물)의 경우 뉴트라팜을 통해 제공받기로 함

- 고추의 경우 많은 노지에서 여러 품종을 섞어 재배하기 때문에 한 가지 품종의 고추만 구매하기에는 현실적인 어려움이 있음. 수확시기의 경우 주로 7월~10월경 수확이 이루어지며 씨앗의 파종은 1월초, 모종은 4월경 진행하여 수확시기의 차이는 크게 없으며, 고추씨 원물은 건고추에서 과피와 씨앗을 분리하는 과정에서 생성되는 부산물이므로 수확시기에 따른 고추씨의 차이를 확인하기는 어려움이 있음. 따라서, 주요 고추 재배지의 고추씨를 구매하여 원물의 산지별 동등성을 확인하고자 함

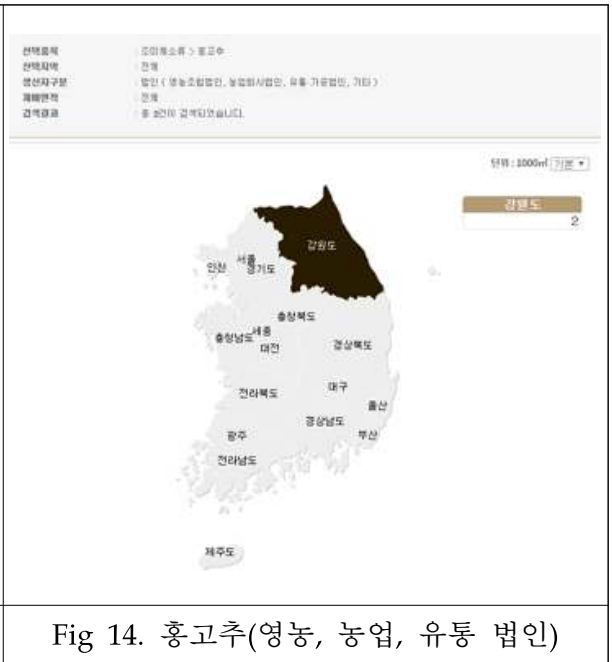
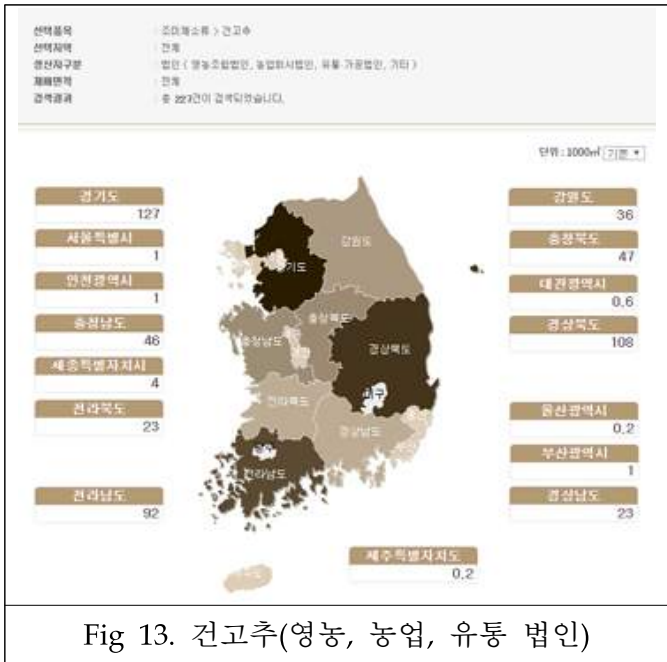


Fig 13. 건고추(영농, 농업, 유통 법인)

Fig 14. 홍고추(영농, 농업, 유통 법인)

<출처 : AT센터 FIS 식품산업통계정보-원료농산물 생산자 정보 DB>

Table 3. 시도별 고추 재배면적

(단위: ha, %)

	2014	2015 (A)	2016 (B)	증감 (C=B-A)	증감률 (C/A)
<b>전 국</b>	<b>36,120</b>	<b>34,514</b>	<b>32,179</b>	<b>-2,335</b>	<b>-6.8</b>
서울특별시	7	24	8	-16	-66.7
부산광역시	48	61	50	-11	-18.0
대구광역시	127	109	118	9	8.3
인천광역시	589	606	393	-213	-35.1
광주광역시	139	84	126	42	50.0
대전광역시	83	78	85	7	9.0
울산광역시	182	157	149	-8	-5.1
세종특별자치시	-	-	182	182	-
경기도	2,919	2,635	2,809	174	6.6
강원도	2,674	2,780	2,076	-704	-25.3
충청북도	3,242	3,168	3,022	-146	-4.6
충청남도	3,792	3,623	3,303	-320	-8.8

전라북도	4,584	4,324	4,909	585	13.5
전라남도	6,792	6,194	5,366	-828	-13.4
경상북도	8,587	8,387	7,426	-961	-11.5
경상남도	2,335	2,234	2,110	-124	-5.6
제주특별자치도	20	50	47	-3	-6.0

<출처 : 2016년 벼, 고추 재배면적 조사 결과 보도자료 (통계청, 2016)>

- 홍고추 및 건고추의 경우 경기(여주), 경북(청송, 영양, 봉화, 안동), 전남(해남), 충북(괴산), 충남(태안, 홍성)의 노지에서 주로 재배되는 것으로 조사되었으며 통계청 보도에 따랐을 때 경북, 전남, 전북, 충남, 충북의 순서로 재배됨을 확인함
- 문헌조사를 통해 중복되는 경북, 전남, 충북 지역의 고추씨를 구매하고자 통신판매(인터넷)을 통해 대량구매가 용이한 업체를 각각 선정하였음

Table 4. 산지별 고추씨 원산지 증명서 (※고추의 경우 대부분의 생산업체가 ‘국내산’으로 표기함)

괴산장터영농조합법인 (괴산)	농업회사법인탐나니 (안동)	이산아리 (영월)	천사의땅영농조합법인 (해남)

## (2) 산지별 고추씨 추출물의 비교

### (가) 성상 및 가공적성 비교

- 각 산지별로 구매한 고추씨를 전남생물산업진흥원에서 pilot 추출한 결과는 평균 수율은 6.18%이며, 성상에서는 큰 차이가 없었으나 해남고추씨 추출물의 경우 색상이 옅음. 기존 추출과 비교 시 괴산 고추씨를 제외하면 전반적으로 농축 수율이 높게 나왔으며(계절에 따른 침지온도 차이가 원인으로 추정) 분무건조 시 기력에 달라붙는 케이킹 현상이 더 심함

Table 5. 원산지별 고추씨 추출 수율 및 성상 비교

	괴산	안동	영월	해남	영양(기준)
수율 (%)	4.43%	6.25%	6.79%	7.24%	6.21%

사진	 <괴산>	 <안동>	 <현편>	 <해남>	 <영양>
	 <괴산>	 <안동>	 <현편>	 <해남>	 <영양>
성상 및 가공 적성	몽침 현상이 심함	기존 영양고추씨 추출물과 성상과 가공적성이 비슷함		색상이 옅으며 몽침 현상이 있음	-
	이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 미갈색 분말로 기존 영양고추씨 추출물과 비교하여 맛과 향이 크게 다르지 않음				

(나) HPLC 크로마토그램 패턴 분석

- 산지별 고추씨 추출물의 크로마토그램 패턴 분석 및 동등성을 확인하기 위해 HPLC 분석함

Table 6. HPLC 분석 조건

항목	조건		
주입량	10 $\mu$ L		
칼럼온도	실온		
A 용액: 0.2% 아세트 산, B 용액: 아세토니트릴			
이동상	시간(분)	A 용액 (%)	B 용액 (%)
	0	95	5
	30	45	55
	31	0	100
	40	0	100
	50	95	5
	55	95	5
검출기 파장	UV 280 nm		
유량	1 mL/분		
분석시간	70분		
시료전처리	시료 0.5 g을 25 mL 50% 메탄올에 녹여, 상등액을 0.45 $\mu$ m Nylon 멤브레인 필터로 여과함 (5분간 초음파 처리 후 70° C로 가열하여 녹임)		

- 괴산 고추씨 추출물의 경우 초음파 및 가열 처리 후에도 용매에 녹지 않아 분석에서 제외함. 물질의 함량은 차이가 있을 수 있으나 영양, 안동, 해남, 영월지역의 고추씨 추출물의 주요

- peak 패턴이 대부분 일치하여 원산지별 고추씨 추출물의 동등성을 확인함
- 같은 샘플 내에서 전처리 용매에 따른 크로마토그램의 변화는 보이지 않음

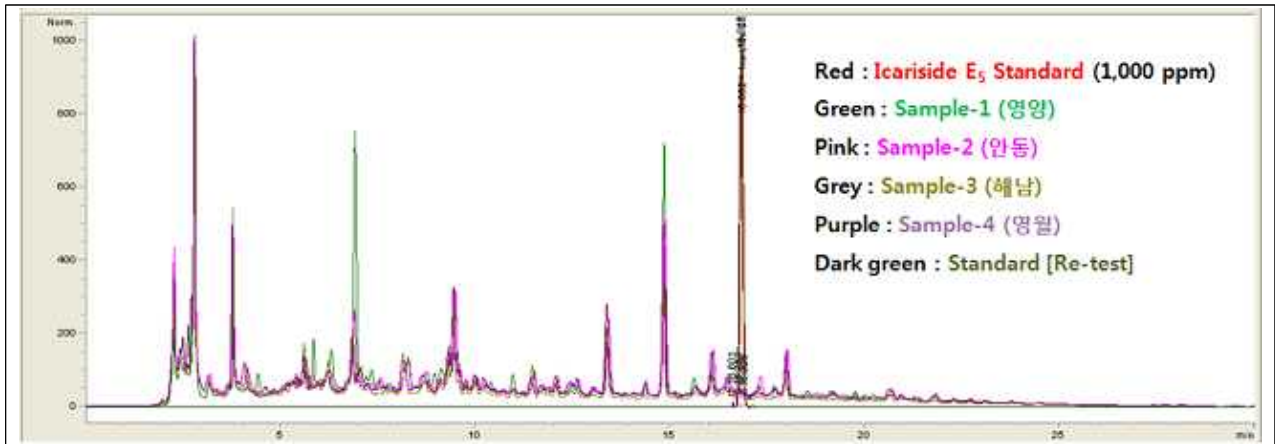


Fig 15. 산지별 고추씨 추출물의 크로마토그램 (overlay)

## 2. 추출법의 표준화 및 Scale-up

### 가. 고추씨 추출법의 표준화

#### (1) 동물실험 및 인체적용시험용 고추씨 추출물의 추출법 확보

- 선행 연구에서, 4℃ 물 추출 및 FD 추출법으로 지방분화 억제 효과를 확인하였기에, 본 추출법을 기반으로 대량생산이 가능한 방법으로 일부 변경하여 추출하였음
- 실온조건에서 물 추출을 시행하였고(대량 생산 시, 4℃로 정치시킬 장치 국내에 없으며 온도를 유지하기 위해 고온 스티밍 등이 들어갈 경우 많은 비용이 소모되어 대량 추출에 어려움이 있음), SD와 FD로 나누어 추출 시행함
- SD, FD법 추출물 각각을 다시 지방세포에 처리하여, 지방분화 단백질의 발현을 확인하였고, SD와 FD 추출물 모두 지방분화 억제 효과가 있었고, 추후 제품화 시, 단가적으로 유리한 SD법을 선택하여, 동물실험과 인체적용시험에 모두 사용하기로 함

#### (2) 추출업체 선정

- 1차년도부터 여러 추출업체에 의뢰하여 시생산을 진행함
  - : (주)테코스, 홍천메디컬허브연구소, (주)MSC, 전남생물산업진흥원-식품산업연구센터
- 최종적으로, 건강기능식품 추출 경험이 많고 대량생산 셋팅이 잘되어 있는 전남생물산업진흥원으로 선정
  - : 추후 제품화되어 대량생산 시, (주)MSC를 포함하여 추가 추출업체를 물색하여 추출생산 의뢰 예정임



Table 7. 고추씨 대량생산 제조공정도

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물
원물	영양균 고추씨
↓	
추출	13.2~14.5℃(실온), 22시간 순환 물추출 (물:고추씨= 9:1)
↓	
여과	55 um
↓	
감압농축	70℃ 스팀 (내부온도 약 45℃)
↓	
살균	90℃, 20분
↓	
분무건조(SD)	덱스트린 첨가(고형분 대비 30%), 미분
↓	
포장	

- \* 변경사항 : 1. 원물 추출비용 실온으로 조정  
 2. 대장균 및 일반세균 살균조건에 맞춰 살균공정 조건 변경  
 3. 인습 등의 현상으로 30% 덱스트린 첨가  
 4. 분무건조 후 미분 또는 과립 성상이기에 분쇄공정 삭제

**(3) 고추씨 소량 제조보고**

- 제조장 : 전남식품산업연구센터
- 사용장비



열수추출기



분무건조기

- 추출기: 열수추출기 pilot / 모델명: YC-EC-50\*2 / 제조사: YENCHEN(대만)
- 농축기: 원심박막농축기 pilot / 모델명: CEP-LABO / 제조사: OKAWARA(일본)

○ 고추씨 추출물



- input : 4.5kg \* 2회 = 9kg
- 추출 : 원물대비 9배수(40.5kg) / 추출(침지)온도: 8.8~11℃
- 여과 : 추출 후 필터링 55μm
- 농축 : 70℃, 1,200rpm  
2.08kg (23.9brix /건조감량:25.4%) - brix 기준수율: 5.5%
- 살균 : 90℃ 20분
- 여과 : 살균 후 필터링 55μm
- 분무건조: 분말 화사 / 덱스트린30% 추가

**문제점**

- 원액으로 분무건조시 장비 내부에 달라붙는 현상이 있음, 분말은 화사가 되지  
만 마찬가지로 분말끼리 뭉치는 현상이 발생함
- 따라서 덱스트린(고형분 대비 30%)을 첨가하여 생산
- 농축액 원심분리 결과 층분리가 눈에 띌 정도로 되지 않음. 따라서 대량 생산  
공정에는 적용이 어려움
- pilot 장비(미분형)이지만 실 생산용 장비는 과립형 분무건조기임

※ 최종수율 : 4.26% (input : 9 kg | final product I(100% 고추씨) : 0.093 kg  
| final product II(30% 덱스트린) : 0.291 kg)  
원물수율(덱스트린 제외) : 3.29% (input : 9 kg | final product : 0.2967 kg)

Table 8. 고추씨 소량 추출 분말 비교

 <p>고추씨 SD 분말 (ㅇ 전남) 93g</p>	 <p>고추씨 SD 분말 (전남) dextrin 30% 첨가 271g</p>
100% 고추씨 SD분말	덱스트린 30%첨가 고추씨 SD 분말
* 상온, 공기 중에 보관 시 일주일 이내 돌처럼 딱딱하게 굳는 현상 있음	



## 나. 고추씨 추출법의 Scale-up

### (1) 영양군 고추씨 사용

- 영양군 고추유통공사에서 동일지역 동일한 기후에서 재배하고, 타 고추품종이 섞이지 않도록 체계적인 관리를 통하여, 균일한 품종의 고추를 재배
- 영양군 대표브랜드인 “빛갈찬” 고추에서 씨만을 분리하여 사용
- 200kg의 고추씨로 시 추출 후, 1톤의 고추씨로 대량추출 수행
- 텍스트린 30% 첨가 및 수율 약 4%로 60kg 이상 생산

### (2) 고추씨 대량생산 제조보고서

- 제조장 : 전남식품산업연구센터
- 사용장비
- 추출기: 열수추출기(5t) / 모델명: K13-EC-01/05/06(3대) / 제조사: (주)코세인(한국)
- 농축기: 원심박막농축기 / 모델명: CEP-20S / 제조사: OKAWARA(일본)  
자연순환농축기 / 모델명: K11-NCC-01 / 제조사: (주)코세인(한국)

#### ○ 고추씨 추출물

- Input : 고추씨 1,050kg
- 추출 : 원물대비 9배수 / 추출(침지)온도: 13.2~14.5℃
- 여과 : 추출액 필터링 10 $\mu$ m (하우징필터)
- 농축 : 스팀온도 75~80℃, 500rpm (내부온도 45℃ 이하)  
200kg(28.2brix /건조감량:30.77%) - brix 기준수율: 5.4%
- 여과 : 농축액 필터링 55 $\mu$ m (백필터 사용)
- 살균 : 90℃, 20분
- 분무건조: 텍스트린 첨가(고형분 대비 30%)  
 $200 * 30.77\% = 61.54\text{kg}(\text{농축액 고형분}) + \text{퓨어텍스 } 26.37\text{kg}$

#### 문제점

- 텍스트린 없이 원물로 진행 시 공기 중에 노출될 경우 빠르게 굳는 현상이 있음. 따라서 30% 텍스트린을 첨가하여 진행하기로 함
- 과립라인으로 작업하였으나 챔버 내부에 케이킹 발생
- 분말을 다시 녹여서 미분라인으로 작업하기에는 Loss 가 너무 많이 발생하여 분쇄하는 것으로 결정함. 과립분말과 케이킹 분말을 섞어 분쇄

※ 최종수율 : 6.21% (input : 1,050 kg | final product : 65.3 kg)

원물수율(텍스트린 제외) : 4.35% (input : 1,050 kg | final product : 45.71 kg)

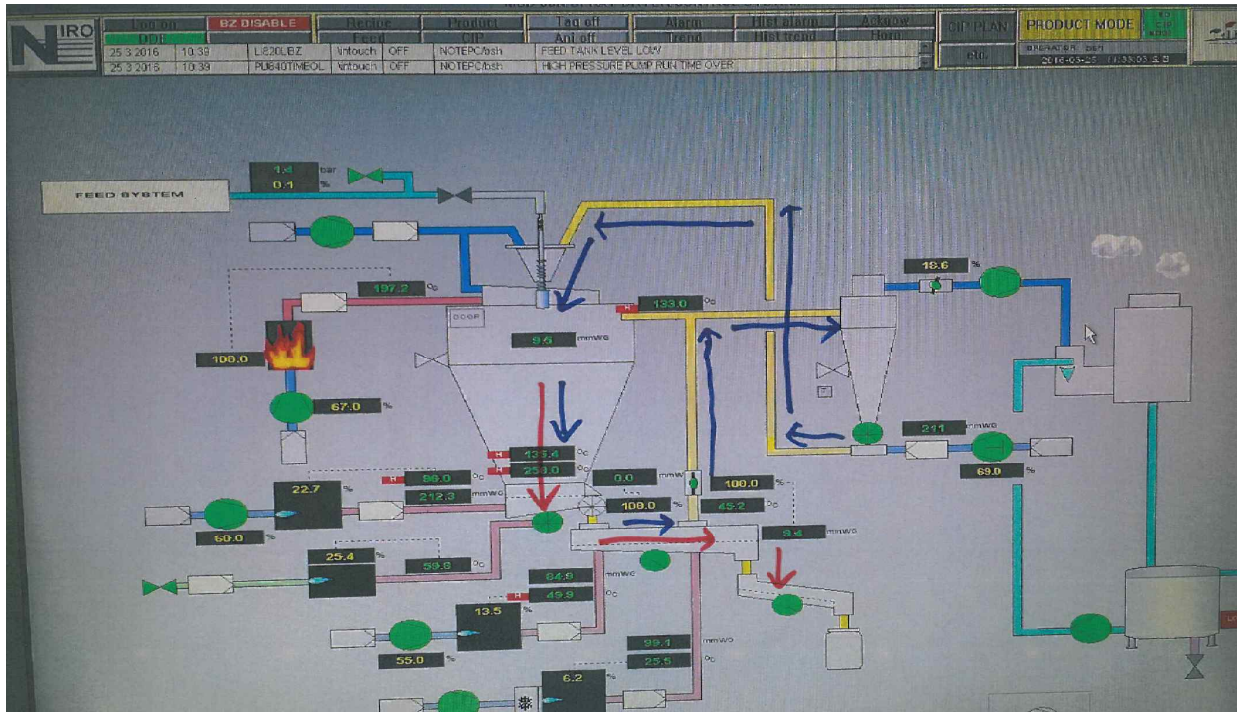


Fig 16. SD장비 공정 흐름도

\* 붉은색 : 미분라인, 파란색 : 과립라인

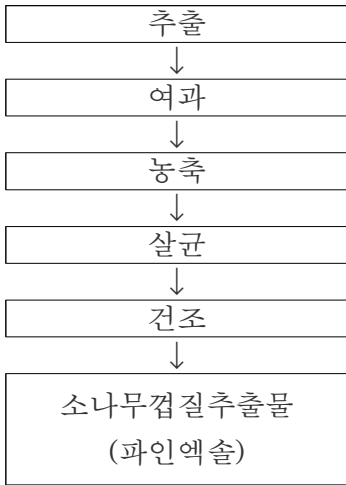
#### 다. 고추씨 추출물의 반복 추출 및 제조공정도 확립

- 3 Lots 반복 추출을 위해 부용농산(안동)으로부터 고추씨 원물 150 kg을 구매하여 반복 추출하였으며 평균 수율은 Brix 기준으로 약 7%(덱스트린 포함)임. 그러나 건조 시 챔버 내 회수율이 많이 떨어졌으며 최종 산물 중 덱스트린을 제외한 고추씨 추출물의 수율은 약 2.5%로 계산됨

Table 9. 고추씨 추출물의 제조공정도

(1) 제조공정	(2) 공정, 식품, 식품첨가물	(3)기능/지표성분 함량변화(mg/g)	(4) 수율(kg)
고추씨 선별	국내산 고추(홍고추) 씨		50
↓			
추출	원물대비 8배수* 이상의 정제수 실온, 16~24시간 순환추출		535
↓			
여과	55 um 백필터		
↓			
농축	감압농축		12.3
↓			
살균	90℃ 이상, 20분		
↓			





열수

### 3. 지표물질의 분리 및 분석법 확립

#### 가. 고추씨 추출물의 지표물질 후보 선정

##### (1) 지표성분(Icariside E<sub>5</sub>) 분리 및 구조결정

- 고추씨 추출액을 H<sub>2</sub>O에 현탁시켜 celite로 여과한 후 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피를 이용하여 H<sub>2</sub>O-MeOH을 0%~100%, 50% acetone까지 농도를 높였으며 TLC를 실시하여 분획으로 나누고 MCI-gel CHP20P를 이용하여 H<sub>2</sub>O-MeOH을 0%~100%까지 농도를 높였고 prep HPLC 를 통해 Icariside E<sub>5</sub>를 분리하였음 (Fig. 17)

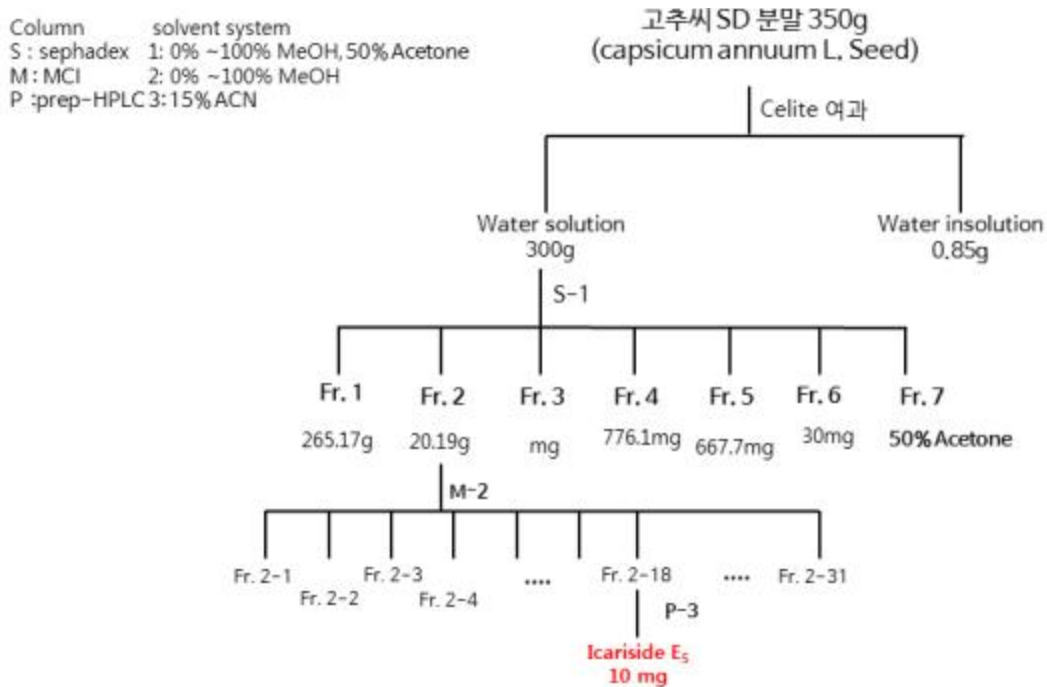


Fig 17. Icariside E<sub>5</sub> 분리

- Icariside E<sub>5</sub> 의 구조결정

: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O as solvent): δ 6.93 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-2'), 6.90 (1H, d, J = 1.9 Hz, H-6'), 6.68 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-2), 6.57 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5), 6.50 (1H, d, J = 15.9 Hz, H-7'), 6.48 (1H, dd, J = 8.0, 2.0 Hz, H-6), 6.30 (1H, dt, J = 15.9, 5.4 Hz, H-8'), 4.67 (1H, d, J = 7.2 Hz, H-1'), 4.17 (1H, d, J = 5.4 Hz, H-9'), 4.00 (1H, m, H-8), 3.79 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-10'), 3.74 (1H, dd, J = 11.4, 2.4 Hz, H-6' a), 3.72 (1H, dd, J = 10.8, 5.4 Hz, H-9-a), 3.68 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-10), 3.64 (1H, dd, J = 11.4, 5.4 Hz, 2H), 3.47 (1H, m, H-3'), 3.40 (1H, m, H-4'), 3.15 (1H, ddd, J = 9.8, 5.4, 2.4 Hz, H-5'), 3.02 (1H, dd, J = 14.2, 5.4 Hz, H-7a), 2.71 (1H, dd, J = 14.2, 9.9 Hz, H-7b). (Fig. 18)

: <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, Acetone-d<sub>6</sub>) δ 153.20 (C-3'), 148.36 (C-3), 145.39 (C-4), 144.87 (C-4'), 138.99 (C-5'), 135.40 (C-1'), 133.13 (C-1), 130.66 (C-7'), 130.57 (C-8'), 122.52 (C-6), 119.11 (C-6'), 115.78 (C-2), 113.82 (C-5), 109.09 (C-2'), 105.60 (C-1'), 77.97 (C-3'), 77.52 (C-5'), 75.81 (C-2'), 70.84 (C-4'), 67.04 (C-9), 63.32 (C-9'), 62.32 (C-6'), 56.78 (C-10), 56.59 (C-10'), 42.16 (C-8), 38.86 (C-7)

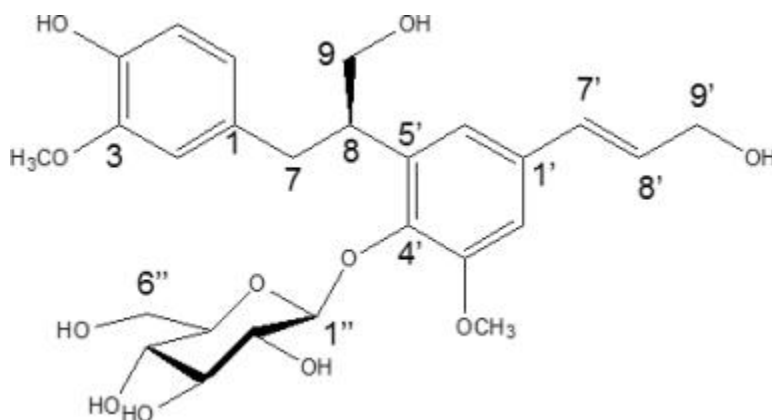


Fig 18. Icariside E<sub>5</sub>의 구조

(2) 지표성분(Vanilloyl icariside E<sub>5</sub>) 분리 및 구조결정

- 고추씨 추출액을 H<sub>2</sub>O에 현탁시켜 celite로 여과한 후 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피를 이용하여 H<sub>2</sub>O-MeOH을 0%~100%, 50%acetone까지 농도를 높였으며 TLC를 실시하여 분획으로 나누고 MCI-gel CHP20P를 이용하여 H<sub>2</sub>O-MeOH을 0%~100%까지 농도를 높였고 ODS-gel를 이용하여 H<sub>2</sub>O-MeOH을 20%~100%까지 농도를 높임. 마지막으로 Sephadex LH-20 80% EtOH를 통해 Vanilloyl icariside E<sub>5</sub>를 분리하였음 (Fig 19)

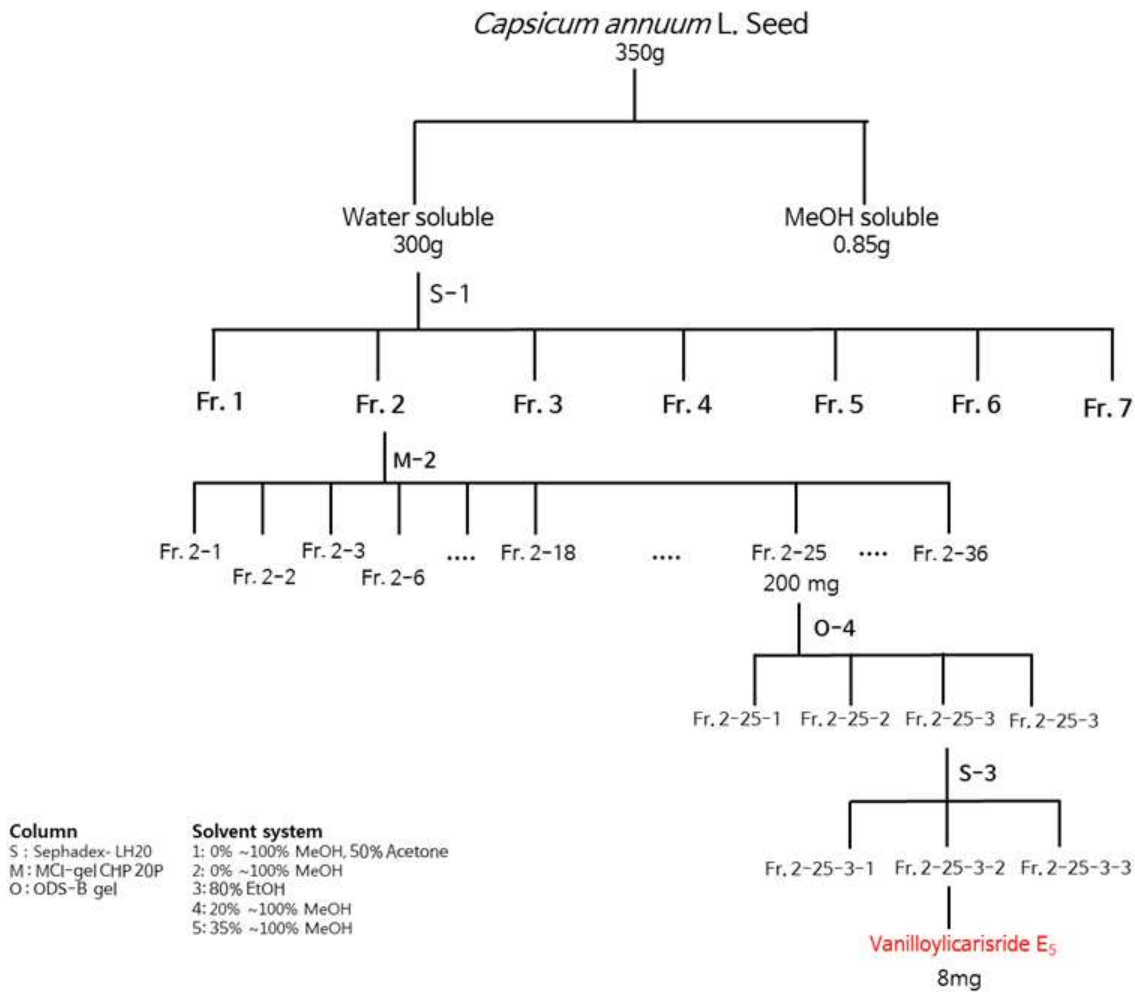


Fig 19. Vanilloylicarisiide E<sub>5</sub>의 분리

- Vanilloylicarisiide E<sub>5</sub>의 구조결정

: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>+D<sub>2</sub>O as solvent): δ 7.29 (1H, J=1.8 Hz, H-2'''), δ 7.27 (1H, J=8.4, 1.8 Hz, H-6'''), δ 6.91 (1H, d, J=1.8 Hz, H-2'), δ 6.84 (1H, d, J=1.8 Hz, H-6'), δ 6.76 (1H, d, J=8.4 Hz, H-5'''), δ 6.62 (1H, d, J=1.8 Hz, H-2), δ 6.51 (1H, d, J=7.8 Hz, H-5), δ 6.45 (1H, d, J=16.2 Hz, H-7'), δ 6.43 (1H, dd, J=7.8 Hz, 1.8, H-6), δ 6.27 (1H, dt, J=16.2, 5.4 Hz, H-8'), δ 4.72 (1H, d, J=7.2 Hz, H-1''), δ 4.47 (1H, dd, J=12.0, 2.4 Hz, H-6''a), δ 4.11 (1H, dd, J=12.0, 6.0 Hz, H-6''b), δ 4.09 (2H, d, J=5.4 Hz, H-9'), δ 3.76 (1H, m, H-8), δ 3.69 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-10'), δ 3.67 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-10), δ 3.61 (3H, s, OCH<sub>3</sub>-8'''), δ 3.57 (1H, dd, J=5.4, 10.2 Hz, H-9a), δ 3.37 (1H, dd, J=7.2, 10.2 Hz, H-9b), δ 3.30 (1H, m, H-2''), δ 3.29 (1H, m, H-3'''), δ 3.24 (1H, m, H-4''), δ 3.20 (1H, m, H-5''), δ 2.95 (1H, dd, J=13.8, 6 Hz, H-7a), δ 2.66 (1H, dd, J=13.8, 9.0 Hz, H-7b)(Fig. 20)

:  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz,  $\text{DMSO-d}_6+\text{D}_2\text{O}$  as solvent):  $\delta$  166.7 (C-7'''),  $\delta$  151.8 (C-3'),  $\delta$  151.4 (C-4'''),  $\delta$  147.3 (C-3),  $\delta$  147.1 (C-3'''),  $\delta$  144.1 (C-4),  $\delta$  142.7 (C-4'),  $\delta$  137.8 (C-5'),  $\delta$  135.2 (C-1'),  $\delta$  132.9 (C-2'''),  $\delta$  131.7 (C-1),  $\delta$  129.7 (C-7'),  $\delta$  128.9 (C-8'),  $\delta$  123.7 (C-6'''),  $\delta$  121.1 (C-6),  $\delta$  120.7 (C-1'''),  $\delta$  118.6 (C-6'),  $\delta$  115.2 (C-5'''),  $\delta$  114.9 (C-2),  $\delta$  112.9 (C-5),  $\delta$  108.1 (C-2'),  $\delta$  103.0 (C-1''),  $\delta$  76.2 (C-3''),  $\delta$  74.4 (C-5''),  $\delta$  74.2 (C-2''),  $\delta$  71.1 (C-4''),  $\delta$  64.3 (C-9),  $\delta$  64.0 (C-6''),  $\delta$  61.6 (C-9'),  $\delta$  56.0 (C-10),  $\delta$  55.6 (C-8'''),  $\delta$  55.5 (C-10'),  $\delta$  41.1 (C-8),  $\delta$  36.9 (C-7)(Fig. 20).

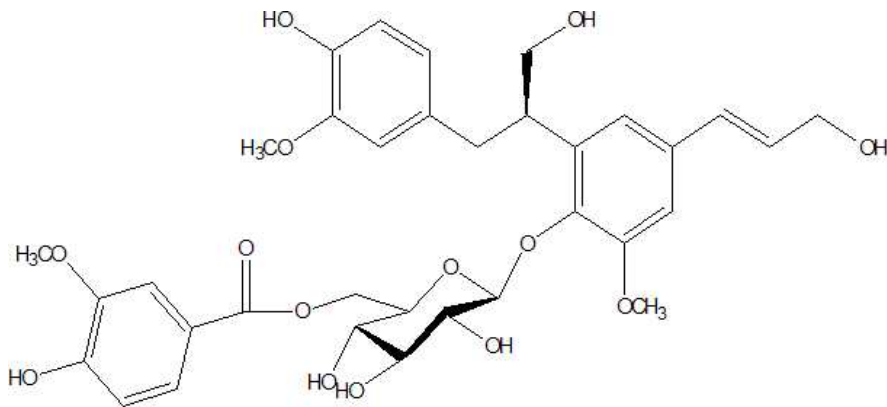


Fig 20. Vanilloyl icariside E<sub>5</sub>의 구조

## 나. 파인엑솔의 지표물질 후보 선정

### (1) 파인엑솔에서 지표성분의 분리 및 구조결정

- 파인엑솔을  $\text{H}_2\text{O}$ 에 현탁시켜 celite로 여과한 후 Sephadex LH-20 컬럼크로마토그래피를 이용하여  $\text{H}_2\text{O-MeOH}$ 을 0%~100%, 50% acetone까지 농도를 높였으며 TLC를 실시하여 분획으로 나누고 MCI-gel CHP20P를 이용하여  $\text{H}_2\text{O-MeOH}$ 을 0%~100%까지 농도를 높이며 Taxifolin을 분리하였으며 ODS를 이용하여  $\text{H}_2\text{O-MeOH}$ 을 0%~100%까지 농도를 높이며 (+)-catechin을 분리하였음(Fig 21)

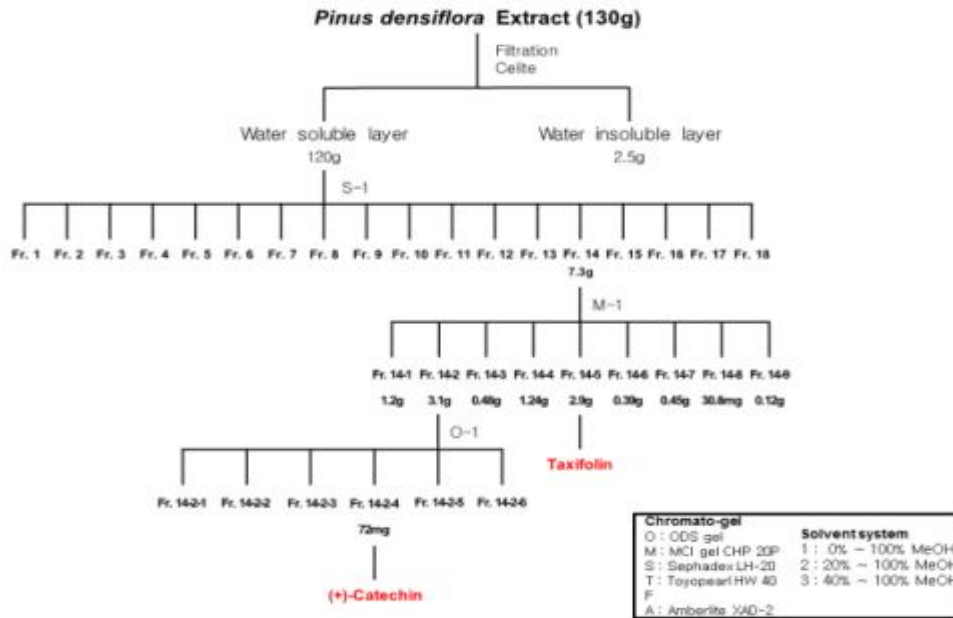


Fig 21. 파인엑스 추출물 분리 Flow chart

- Taxifolin의 구조결정

:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6+\text{D}_2\text{O}$  as solvent):  $\delta$  7.02 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-2'), 6.86 (1H, dd,  $J = 1.9, 8.1$  Hz, H-6'), 6.84 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 5.95 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 5.90 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 4.97 (1H, d,  $J = 11.4$  Hz, H-2), 4.56 (1H, d,  $J = 11.4$  Hz, H-3) (Fig. 22)

- (+)-catechin의 구조결정

:  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz,  $\text{DMSO-d}_6+\text{D}_2\text{O}$  as solvent):  $\delta$  6.85 (1H, d,  $J = 1.9$  Hz, H-2'), 6.76 (1H, d,  $J = 8.1$  Hz, H-5'), 6.68 (1H, dd,  $J = 8.1, 1.9$  Hz, H-6'), 5.99 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-8), 5.82 (1H, d,  $J = 2.1$  Hz, H-6), 4.50 (1H, d,  $J = 7.8$  Hz, H-2), 3.96 (1H, m, H-3), 2.84 (1H, dd,  $J = 5.5, 16.1$  Hz, H-4a), 2.47 (1H, dd,  $J = 8.5, 16.1$  Hz, H-4b) (Fig. 22)

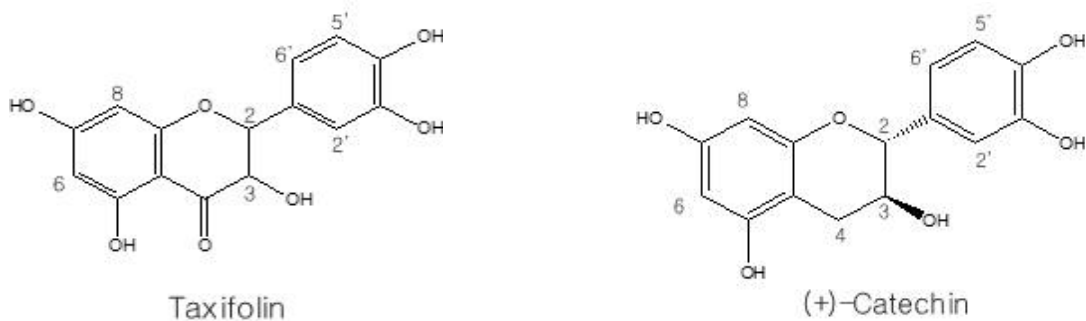


Fig 22. Taxifolin 및 (+)-catechin의 구조



## 다. 고추씨 추출물의 지표물질 분석법 확립 및 검증

### (1) 고추씨 HPLC 분석법 확립 및 validation

#### (가) HPLC 분석법 확립

- ① 검액의 조제 - 고추씨추출물 5 mg을 1 mL용매에 녹여서 HPLC 검액으로 사용하였음
- ② HPLC 조건 - HPLC 조건은 Table 12와 같이 설정했음. HPLC 결과는 Fig 23과 같음

Table 12. HPLC condition of Icariside E<sub>5</sub>

HPLC condition			
Column	Kromasil 100-5-C18		
Flow rate	1 ml/min		
UV length	280 nm		
Injection volume	10 $\mu$ l		
Mobile solvent	A: Water B:Acetonitrile		
	Time(min)	A	B
	0	95	5
	30	45	55
Mobile Phase	45	0	100
	55	0	100
	60	95	5
	70	95	5

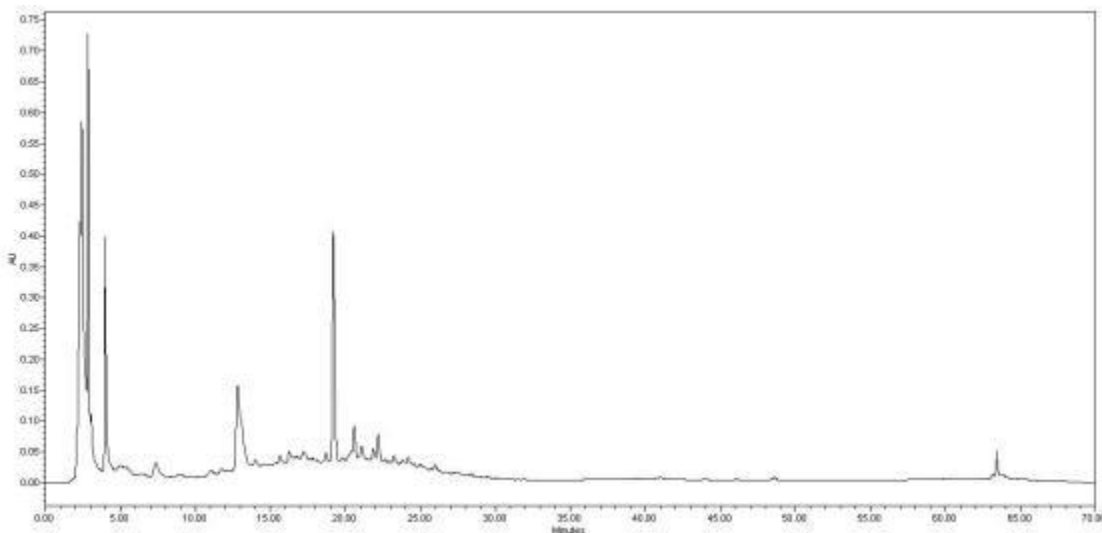


Fig 23. 고추씨 HPLC 분석 결과

#### (나) Icariside E<sub>5</sub> 지표성분의 validation

- ① 특이성: HPLC를 이용해 고추씨의 chromatography를 비교하여 Icariside E<sub>5</sub>의 피크가 분리되는 지를 확인한 결과, 다른 성분과 간섭 없이 성분이 분리되었다. 표준 용액 Icariside E<sub>5</sub>의 RT는 19.49분으로 확인하였음(Fig. 24).

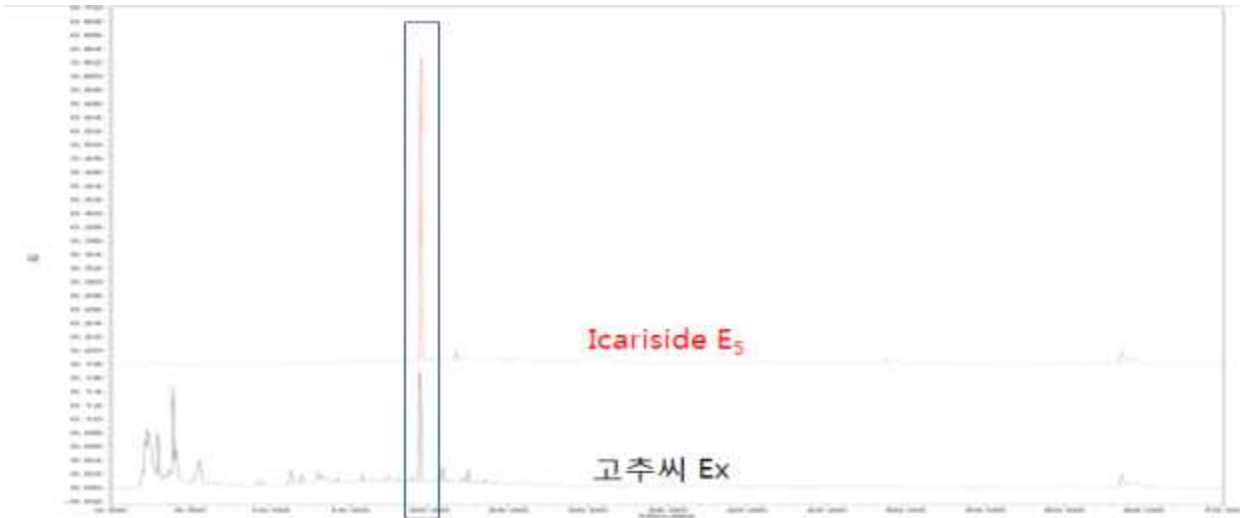


Fig. 24 Specificity of Icariside E<sub>5</sub>

② 검량선, 직선성(Linearity)

- Icariside E<sub>5</sub> : HPLC로 분석하여 작성한 검량선의 Linear regression equation은  $Y=12428X+137720$ 이며, 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 0.9998로 높은 직선성을 보임(Fig. 25).

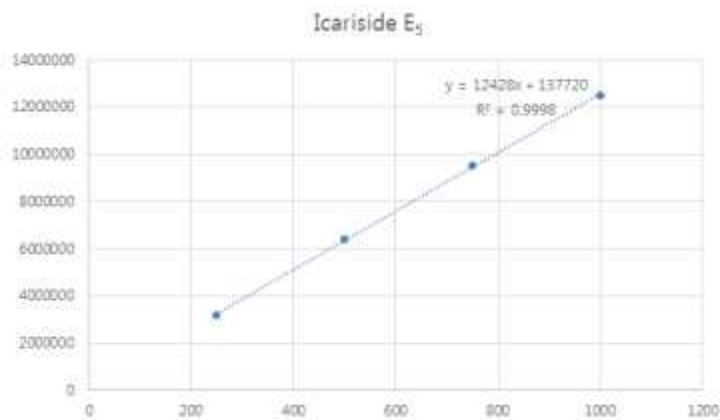


Fig. 25 Linearity of standards of Icariside E<sub>5</sub>

\* y: peak area, x: concentration, R: Correlation coefficient

③ 정량한계(LOQ) : 정량한계(LOQ)공식을 이용하여 정량한계를 구하였음. Icariside E<sub>5</sub>의 정량한계는 94.87 ug/mL으로 확인하였으며 소량인 성분도 정량이 가능함을 확인하였음(Table 13).

Table 13. Linear ranges and LOQ of standards

Compounds	Linear range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Response Slope(a)	Response Factor(b)	Correlation Coefficient( $R^2$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Icariside E <sub>5</sub>	250~1000	12428	137720	0.9998	94.87

## ④ 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision)

- Icariside E<sub>5</sub>의 정확성은 98.33~101.75% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로서 0.40~1.62%로 양호한 값을 나타내었음(Table 14)

Table 14. Precision and accuracy of analytical results

Compounds	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Accuracy (%)		Precision (c.v.,%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
Icariside E <sub>5</sub>	250	102.27	101.75	1.62	1.01
	500	99.56	99.05	0.95	0.60
	750	98.33	99.52	0.65	1.07
	1000	100.91	100.40	0.40	0.50

## ⑤ 지표 성분의 함량 평가

- 함량분석(Content) : 확립된 분석법을 이용하여 지표성분의 함량을 측정된 결과 고추씨 내 Icariside E<sub>5</sub>의 함량은 0.28%로 확인하였음(Table 15)

Table 15. Contents of Icariside E<sub>5</sub>

Icariside E <sub>5</sub>	
<i>Capsicum annuum</i>	0.28%

⑥ 고추씨 지표성분 회수율 분석: 지표성분 (Icariside E<sub>5</sub>)의 회수율 평가

- 고추씨 추출물과 지표물질을 혼합하여, 최종적으로 추출물 10000ppm, 지표물질 125ppm를 통해 회수율 실험을 진행하였음. (혼합물 함량 - 추출물 함량) / 지표물질 함량 \*100%) 최종 회수율은 96.20% 임(Fig. 26)

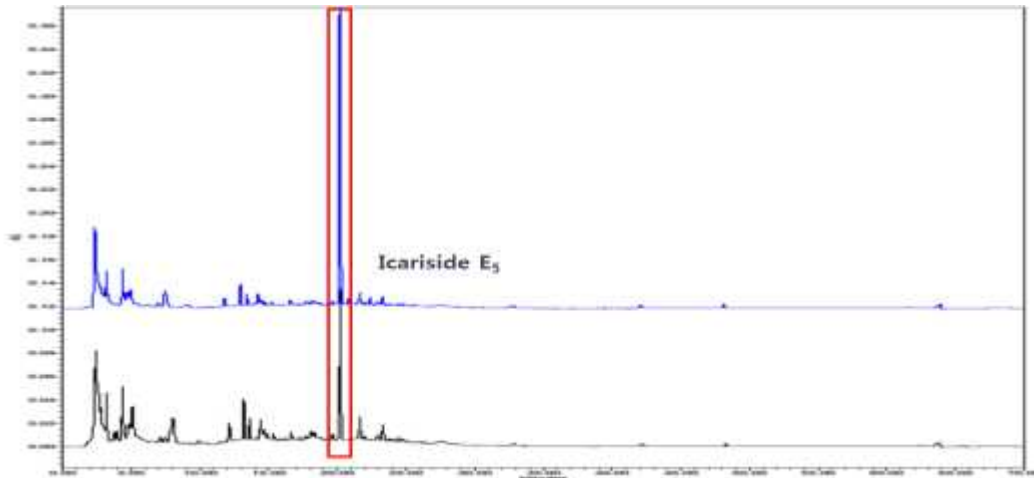


Fig 26. Icariside E<sub>5</sub> 회수율

(다) Vanilloyl icaricide E<sub>5</sub> 지표성분의 validation

- ① 특이성 : HPLC를 이용해 고추씨의 chromatography를 비교하여 Vanilloyl icaricide E<sub>5</sub>의 피크가 분리되는 지를 확인한 결과, 다른 성분과 간섭 없이 성분이 분리됨. 표준용액 Vanilloyl icaricide E<sub>5</sub>의 RT는 21.85분으로 확인하였음 (Fig. 27)

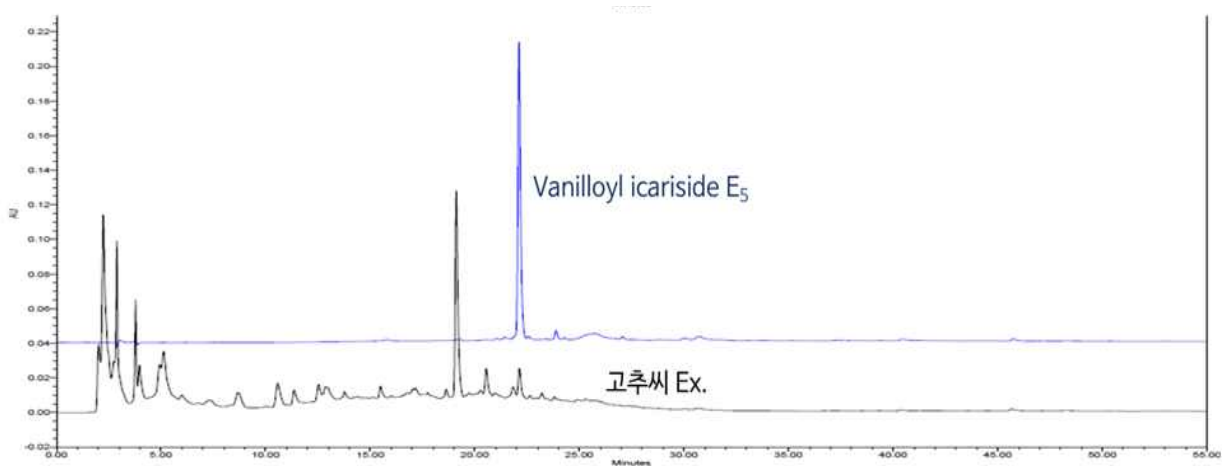


Fig. 27 Specificity of Vanilloyl icaricide E<sub>5</sub>

② 검량선, 직선성(Linearity)

- Vanilloyl icaricide E<sub>5</sub> : HPLC로 분석하여 작성한 검량선의 Linear regression equation은  $Y=12947X-95797$ 이며, 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 0.9999로 높은 직선성을 보임(Fig. 28)

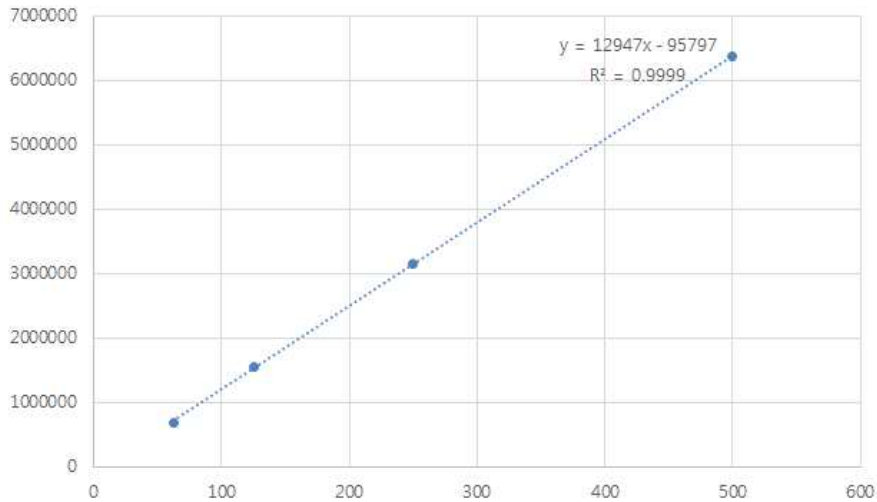


Fig. 28 Linearity of standards of Vanilloyl icaricide E<sub>5</sub>

\* y: peak area, x: concentration, R: Correlation coefficient

- ③ 정량한계(LOQ) : 정량한계(LOQ)공식을 이용하여 정량한계를 구하였음. Vanilloyl icaricide E<sub>5</sub>은 13.38 ug/mL,으로 확인하였으며 소량인 성분도 정량이 가능함을 확인하였음(Table 16)

Table 16. Linear ranges and LOQ of standards

Compounds	Linear range ( $\mu\text{g/mL}$ )	Response Slope(a)	Response Factor(b)	Correlation Coefficient( $R^2$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Vanilloyl icaricide E <sub>5</sub>	62.5~500	12947	-95797	0.9999	13.38

- ④ 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision)

- Vanilloyl icaricide E<sub>5</sub>의 정확성은 98.72~103.50% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동 계수(c.v., coefficient variation)로서 0.14~1.94%로 양호한 값을 나타내었음(Table 17)

Table 17. Precision and accuracy of analytical results

Compounds	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Accuracy (%)		Precision (c.v.,%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
Vanilloyl icaricide E <sub>5</sub>	62.5	98.98	103.50	0.56	1.94
	125	98.84	99.67	1.59	1.64
	250	101.31	98.72	1.01	0.82
	500	99.76	100.29	0.15	0.14

⑤ 지표 성분의 함량 평가

- 함량분석(Content) : 확립된 분석법을 이용하여 지표성분의 함량을 측정한 결과 고추씨 내 Vanilloyl icariside E<sub>5</sub>의 함량은 0.083%로 확인하였음(Table 18)

Table 18. Contents of Vanilloyl icariside E<sub>5</sub>

Vanilloyl icariside E <sub>5</sub>	
<i>Capsicum annuum</i>	0.083%

⑥ 회수율 분석

- 회수율은 불순물, 분해물, 배합성분 등 의 혼재 상태에서 분석대상 물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력이며, 기지의 양을 혼합하여 정량적으로 회수 되는지 확인함
- 고추씨 지표성분 회수율 분석: 지표성분 (Vanilloyl icariside E<sub>5</sub>)의 회수율 평가
- 고추씨 추출물과 지표물질을 혼합하여, 최종적으로 추출물 10000ppm, 지표물질 125ppm를 통해 회수율 실험을 진행하였음. (혼합물 함량 - 추출물 함량) / 지표물질 함량 \*100%) 최종 회수율은 97.50% 임(Fig 29)

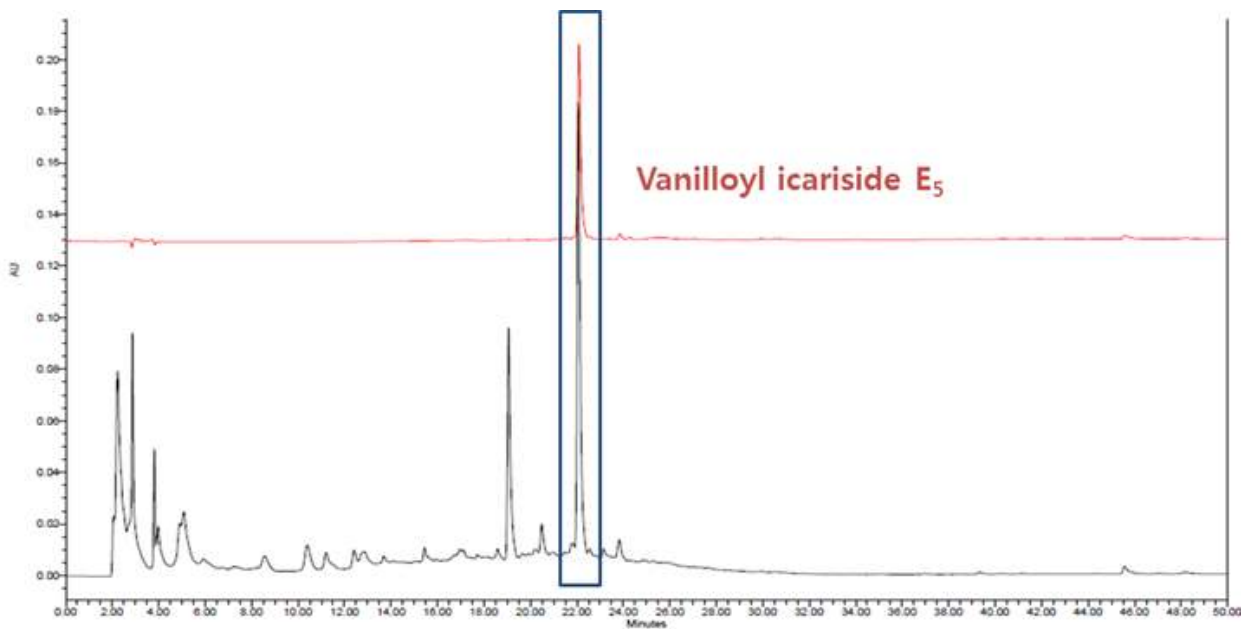


Fig 29. Vanilloyl icariside E<sub>5</sub> 회수율

## 라. 파인엑솔 지표물질 분석법 확립 및 검증

### (1) 파인엑솔에서 HPLC 분석법 확립 및 validation

#### (가) HPLC 분석법 확립

- ① 검액의 조제 : 파인엑솔 5mg을 50% methanol 1mL에 녹여서 HPLC 검액으로 사용하였음
- ② HPLC 조건 : 지표성분인 taxifolin과 (+)-catechin의 분석조건을 Table 19와 같이 설정한 다음, 이 분석조건에 따라 각각의 시료의 validation과 정량분석 실시하였음

Table 19. HPLC condition of taxifolin, (+)-catechin

HPLC condition			
Column	Kromasil 100-5-C18		
Flow rate	1 mL/min		
UV length	280 nm		
Injection volume	10 $\mu$ l		
Mobile solvent	A: 0.2% Acetic acid; B: Acetonitrile		
	Time(min)	A	B
	0	90	10
Mobile Phase	40	70	30
	42	0	100
	52	0	100

#### (나) 지표성분의 validation

- ① 특이성: HPLC를 이용해 파인엑솔의 chromatography를 비교하여 taxifolin, (+)-catechin의 피크가 분리되는 지를 확인한 결과, 다른 성분과 간섭 없이 성분이 분리되었음. 표준용액의 RT는 taxifolin 31.29분, (+)-catechin 14.70분으로 확인되었으며, 파인엑솔 내의 taxifolin과 (+)-catechin의 RT는 각각 31.23분, 14.59분으로 표준용액의 피크 유지시간과 파인엑솔의 피크 유지시간이 거의 일치한 것을 확인함으로써 특이성을 검증하였음(Fig. 30)

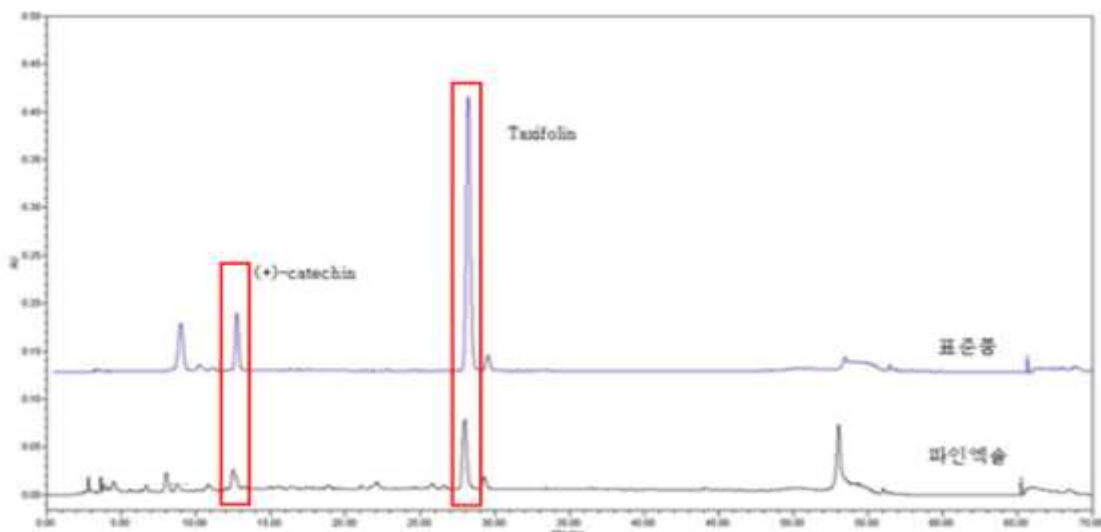


Fig 30. Specificity of taxifolin and (+)-catechin

② 검량선, 직선성(Linearity)

- Taxifolin : HPLC로 분석하여 작성한 검량선의 Linear regression equation은  $Y=5818.6X+21982$ 이며, 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 1로 높은 직선성을 보임(Fig 31)
- (+)-Catechin : HPLC로 분석하여 작성한 검량선의 Linear regression equation은  $Y=622.63X-2504.8$ 이며, 검량선의 상관계수( $R^2$ )는 0.9999로 높은 직선성을 보임(Fig 31)

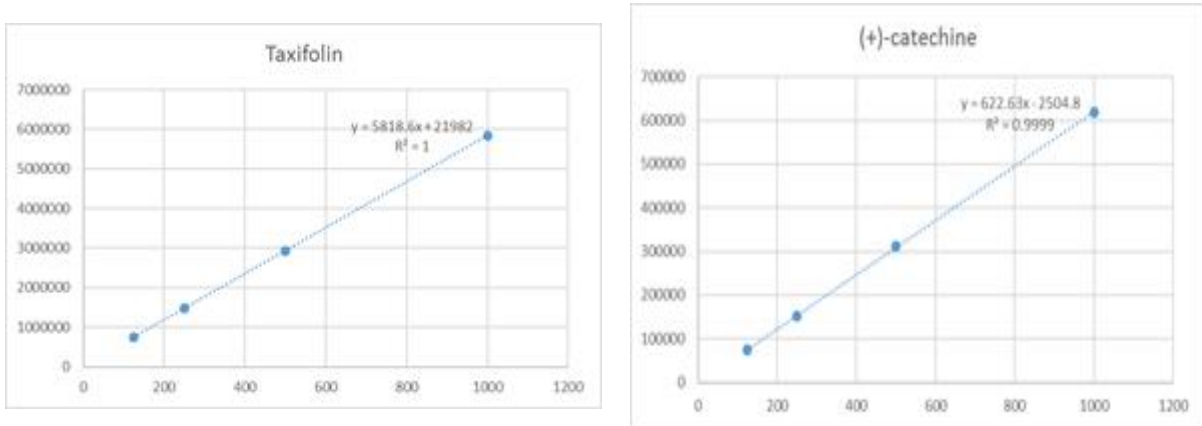


Fig 31. Linearity of standards of Taxifolin and (+)-catechin

\* y: peak area, x: concentration, R: Correlation coefficient

- ③ 정량한계(LOQ) : 정량한계(LOQ)공식을 이용하여 정량한계를 구하였음. Taxifolin은 48.92 ug/mL, (+)-catechin은 0.43 ug/mL으로 확인하였으며 소량인 성분도 정량이 가능함을 확인하였음 (Table 20)

Table 20. Linear ranges and LOQ of standards

Compounds	Linear range (μg/mL)	Response Slope(a)	Response Factor(b)	Correlation Coefficient( $R^2$ )	LOQ (μg/mL)
Taxifolin	125~1000	5818.6	21982	1	48.92
(+)-catechin	125~1000	622.63	-2504.8	0.9999	0.43

④ 정확성(Accuracy) 및 정밀성(Precision):

- Taxifolin의 정확성은 99.00~101.29% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로서 0.15~1.89%로 양호한 값을 나타내었음(Table 21)
- (+)-catechin의 정확성은 99.44~101.62% 이내로 확인하였으며, 정밀성은 변동계수(c.v., coefficient variation)로서 0.26~1.89%로 양호한 값을 나타내었음(Table 21)



Table 21. Precision and accuracy of analytical results

Compounds	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Accuracy (%)		Precision (c.v.,%)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
<b>Taxifolin</b>	1000	99.97	99.99	0.36	0.15
	500	100.03	100.18	1.58	0.82
	250	99.68	99.00	1.21	0.68
	125	100.49	101.29	1.89	0.80
<b>(+)-catechin</b>	1000	100.13	100.02	0.26	0.17
	500	99.44	100.05	1.32	0.90
	250	99.80	99.22	0.76	0.76
	125	101.62	101.21	1.89	1.22

\* Intra-day: three times per day, Inter-day: one time analysis of standards per day for three days,  
c.v.: Coefficient of variation.

⑤ 파인엑솔 지표성분 함량 평가: 지표성분 [Taxifolin, (+)-catechin]의 함량 평가

- 함량분석(Content) : 확립된 분석법을 이용하여 지표성분의 함량을 측정한 결과 파인엑솔 내 taxifolin의 함량은 4.90%로 확인하였으며, (+)-catechin의 함량은 8.19%로 확인하였음(Table 22)

Table 22. Contents of taxifolin and (+)-catechin

	Taxifolin	(+)-catechin
PineXol <sup>®</sup>	4.90%	8.19%

⑥ 파인엑솔 지표성분 회수율 분석

: 지표성분 (Taxifolin 및 (+)-catechin)의 회수율 평가

- 파인엑솔과 지표물질을 혼합하여, 최종적으로 추출물 2500ppm, 지표물질 125ppm를 통해 회수율 실험을 진행하였음. (혼합물 함량 - 추출물 함량) / 지표물질 함량 \*100%) 최종 각 지표성분 (Taxifolin 및 (+)-catechin)의 회수율은 Taxifolin 99.08%, (+)-catechin 99.01%임(Fig 32)

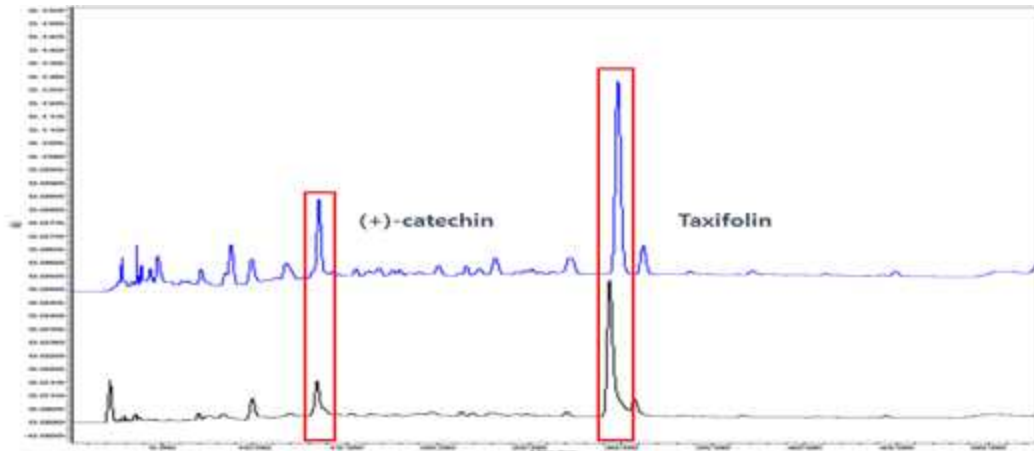
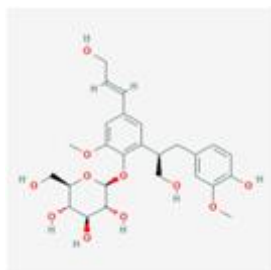
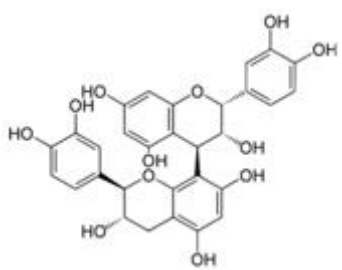
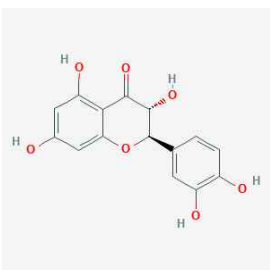


Fig 32. taxifolin과 (+)-catechin 회수율

#### 마. 고추씨 추출물 및 파인엑셀의 지표성분 설정 및 분석법 확립

Table 23. 고추씨추출물, 파인엑셀 복합물의 지표성분

고추씨 추출물 및 파인엑셀 복합물			
원물	고추씨	적송(PineXol)	적송(PineXol)
지표물질	Icariside E <sub>5</sub>	Procyanidin B <sub>1</sub>	Taxifolin
구조			
분자식	C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub>	C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> O <sub>12</sub>	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>7</sub>
Source	<i>Capsicum annuum</i> L, <i>Ehretia thyriflora</i>	red wine, <i>Cinnamomum verum</i> , <i>Uncaria guianensis</i> , <i>Vitis vinifera</i> , Peach	다수의 식물체
판매처	ChemFaces	Sigma aldrich, ChemFaces	Sigma aldrich
비고	고추 특이적인 compound로 지표성분으로 가능함. 단, 표준품 구입이 어려움	Proanthocyanidin 계열로 특이성이 부족함. 단, 기존에 식약처에서 인정한 원료 중 Procyanidin B <sub>1</sub> 을 지표성분으로 한 원료가 없음	최근 식약처 가이드가 완화됨에 따라, 지표물질 후보로 재선정 Taxifolin은 구조도 안정하며 표준품의 수급도 원활하므로 지표물질로 적합함

- 파인엑셀 중 Procyanidin B1의 함량이 더 높게 분석되었으나 표준품의 공급량이 적어 지속적인 관리에 어려움이 있으므로 Taxifolin을 지표물질로 선정함. 최근 들어 식품의약품안전처에서 다소 혼한 물질도 지표물질로 인정해 주고 있기 때문에 가능성이 있다고 판단됨

## 1) Icariside E<sub>5</sub> 분석법

### 1. 장비와 재료

#### 1.1 실험실 장비 및 소모품

- 1.1.1 부피플라스크(갈색, 10 mL, 100 mL)
- 1.1.2 피펫(1000  $\mu$ L, 250  $\mu$ L)
- 1.1.3 용매용 일회용 실린지
- 1.1.4 여과용 멤브레인 필터 (Nylon, 0.45  $\mu$ m)
- 1.1.5 액체크로마토그래프용 유리병
- 1.1.6 초음파분해기(Sonicator)

#### 1.2 분석장비

- 1.2.1 고속액체크로마토그래프
- 1.2.2 자외부흡광광도검출기
- 1.2.3 Kromasil 100-5-C<sub>18</sub> 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 5  $\mu$ m) 또는 이와 동등한 것
- 1.2.4 컬럼오븐

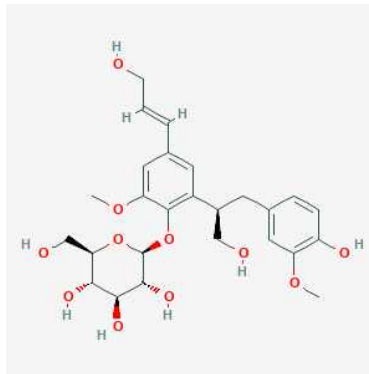
### 2. 표준물질 및 일반시약

#### 2.1 표준물질

##### 2.1.1 Icariside E<sub>5</sub>

Icariside E<sub>5</sub> ((2S,3R,4S,5S,6R)-2-[2-[(2R)-1-hydroxy-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)propan-2-yl]-4-[(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-6-methoxyphenoxy]-6-(hydroxymethyl)oxane-3,4,5-triol)

분자식 : C<sub>26</sub>H<sub>34</sub>O<sub>11</sub> 분자량 : 522.547, CAS No. : 126176-79-2



#### 2.2 일반시약

- 2.2.1 메탄올(Methanol)
- 2.2.2 증류수(Water)
- 2.2.3 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 2.2.4 아세트산(Acetic acid, HPLC grade)

### 3. 시험과정

#### 3.1 표준용액의 제조

- 3.1.1 Icariside E<sub>5</sub> 2.5 mg을 10 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 3.1.2 부피플라스크에 50% 메탄올 10 mL을 첨가한다.
- 3.1.3 마개를 한 후 진탕하여 섞은 후 단계적으로 희석하여 조제·사용한다.

#### 3.2 시험용액의 제조

- 3.2.1 시료 1 g을 달아 100 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 3.2.2 부피플라스크에 50% 메탄올 50 mL를 첨가한다.
- 3.2.3 마개를 한 후 5분간 초음파 처리하여 시료를 완전히 분산시킨다.  
(경우에 따라 시료가 풀어서 분산될 때까지 초음파 처리)
- 3.2.4 이를 0.45 um Nylon 멤브레인 필터로 여과한 용액을 시험용액으로 한다.

### 4. 분석 및 계산

#### 4.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건

항목	조건		
주입량	10 μL		
칼럼온도	실온		
A 용액: 0.2% 아세트 산, B 용액: 아세토니트릴			
이동상	시간(분)	A 용액 (%)	B 용액 (%)
	0	95	5
	30	45	55
	45	0	100
	55	0	100
	60	95	5
	70	95	5
검출기 파장	280 nm		
유량	1 mL/분		
분석시간	70분		

#### 4.2 계산

4.2.1 Icariside E<sub>5</sub> 함량(mg/g)=  $C \times (a \times b) \times p / S$

C : 시험용액의 농도 (ug/mL)

a : 시험용매의 부피(mL)

b : 희석배수

p : 표준품 순도

S : 시료채취량(mg)

\* 시험용액의 농도는 표준품으로 작성된 검량선에 HPLC 결과 값을 대입하여 구한다.

## 2) Taxifolin 분석법

### 1. 장비와 재료

#### 1.1 실험실 장비 및 소모품

- 1.1.1 부피플라스크(갈색, 10 mL, 100 mL)
- 1.1.2 피펫(1000  $\mu$ L, 250  $\mu$ L)
- 1.1.3 용매용 일회용 실린지
- 1.1.4 여과용 멤브레인 필터 (Nylon, 0.45  $\mu$ m)
- 1.1.5 액체크로마토그래프용 유리병

#### 1.2 분석장비

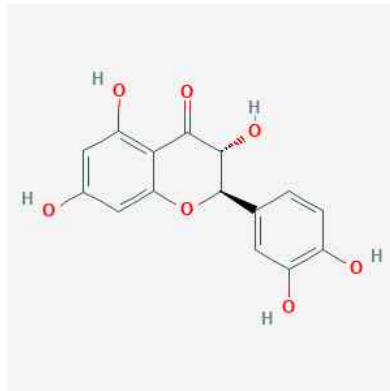
- 1.2.1 고속액체크로마토그래프
- 1.2.2 자외부흡광광도검출기
- 1.2.3 Kromasil 100-5-C<sub>18</sub> 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 5  $\mu$ m) 또는 이와 동등한 것
- 1.2.4 컬럼오븐

### 2. 표준물질 및 일반시약

#### 2.1 표준물질

##### 2.1.1 Taxifolin

Taxifolin ((2R,3R)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-2,3-dihydrochromen-4-one)  
분자식 : C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>O<sub>7</sub> 분자량 : 304.254, CAS No. : 480-18-2



#### 2.2 일반시약

- 2.2.1 메탄올(Methanol)
- 2.2.2 증류수(Water)
- 2.2.3 아세토니트릴(Acetonitrile, HPLC grade)
- 2.2.4 아세트산(Acetic acid, HPLC grade)

### 3. 시험과정

#### 3.1 표준용액의 제조

- 3.1.1 Taxifolin 5 mg을 10 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 3.1.2 부피플라스크에 메탄올 10 mL을 첨가한다.
- 3.1.3 마개를 한 후 진탕하여 섞은 후 단계적으로 희석하여 조제·사용한다.

### 3.2 시험용액의 제조

- 3.2.1 시료 250 mg을 달아 100 mL 부피플라스크에 넣는다.
- 3.2.2 부피플라스크에 50% 메탄올 50 mL를 첨가한다.
- 3.2.3 마개를 한 후 진탕하여 섞은 후 시료를 완전히 분산시킨다.
- 3.2.4 이를 0.45 um Nylon 멤브레인 필터로 여과한 용액을 시험용액으로 한다.

## 4. 분석 및 계산

### 4.1 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건

항목	조건		
주입량	10 $\mu$ L		
칼럼온도	실온		
A 용액: 0.2% 아세트 산, B 용액: 아세토니트릴			
이동상	시간(분)	A 용액 (%)	B 용액 (%)
	0	90	10
	40	70	30
	42	0	100
	52	0	100
	60	90	10
	70	90	10
검출기 파장	280 nm		
유량	1 mL/분		
분석시간	70분		

### 4.2 계산

4.2.1 Taxifolin 함량(mg/g) =  $C \times (a \times b) \times p / S$

C : 시험용액의 농도 (ug/mL)

a : 시험용매의 부피(mL)

b : 희석배수

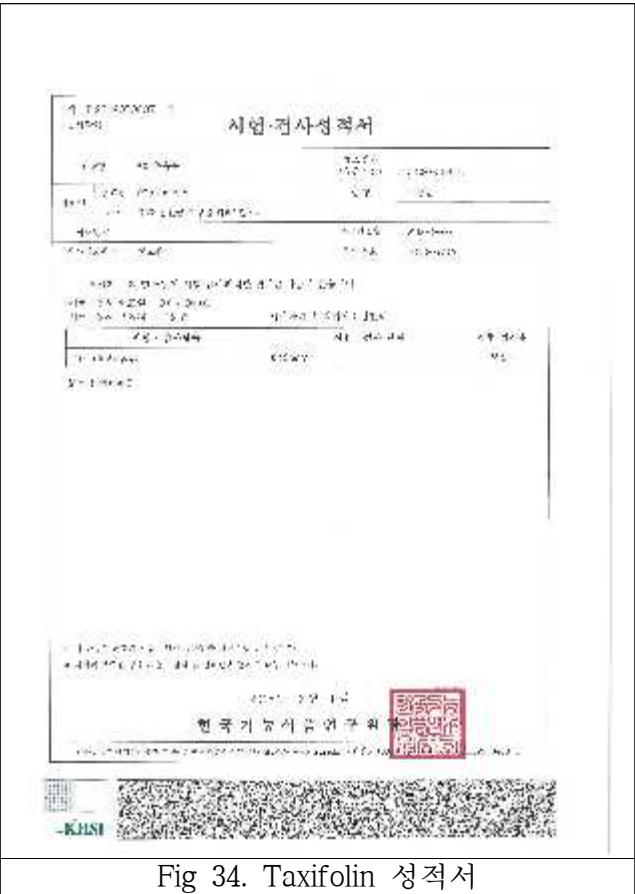
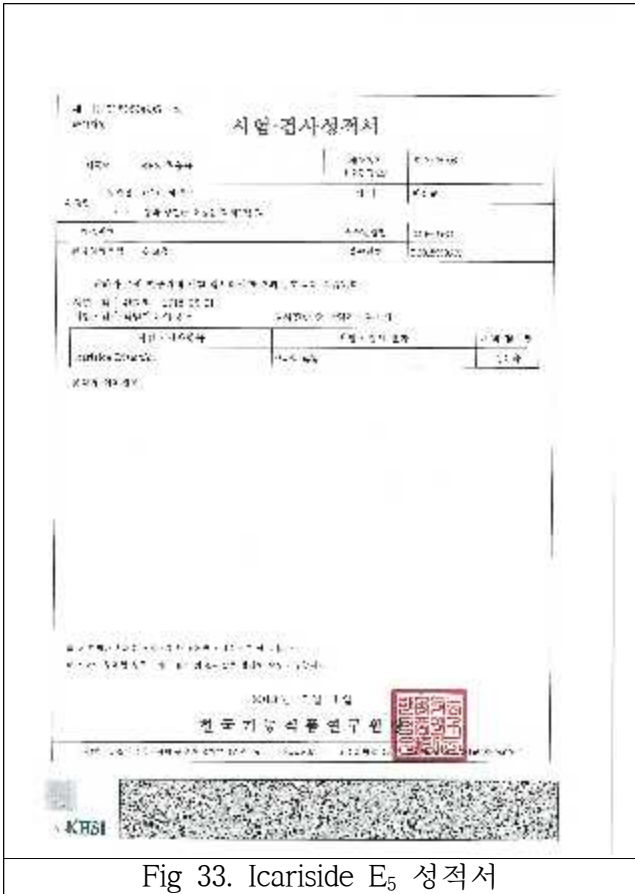
p : 표준품 순도

S : 시료채취량(mg)

\* 시험용액의 농도는 표준품으로 작성된 검량선에 HPLC 결과 값을 대입하여 구한다.

3) 고추씨 추출물 및 파인엑셀에서 Icariside E<sub>5</sub>와 Taxifolin의 함량 분석 결과

- Icariside E<sub>5</sub> : 0.096 mg/g (고추씨 추출물)
- Taxifolin : 8.49 mg/g (파인엑셀)
- 건협 분석결과에 따라 고추씨 추출물의 기준 규격은 Icariside E<sub>5</sub> 0.1 mg/g, 파인엑셀의 기준 규격은 Taxifolin 8.5 mg/g으로 설정함



4. 원료의 품질 및 위해물질 규격 확립

가. 고추씨추출물등 복합물의 영양성분 분석

- 고추씨추출물등 복합물(고추씨+파인엑셀)의 영양성분 분석완료

Table 24. 영양성분 분석 결과 (건협)

성분	함량	성분	함량
열량(Kcal/100 g)	328.96	수분(%)	6.47
탄수화물(%)	70.53	회분(%)	11.94
조지방(%)	0.52	나트륨(mg/100 g)	175.06
조단백질(%)	10.54		



Fig 35. 성상



Fig 36. 영양성분

나. 고추씨추출물등 복합물의 위해물질 분석 및 기준규격 설정

- 한국건강기능식품협회에 고추씨추출물등 복합물 원료 상태에서 위해물질(대장균군, 잔류농약 5종, 잔류농약58종, 중금속4종, 총아플라톡신)을 분석하였으며 아래와 같은 기준규격을 설정함

Table 25. 고추씨추출물등 복합물의 기준 규격

제안 기준 및 규격	시험항목	제안 기준 및 규격	실측치 (시험성적서)	
규격항목	성상		이미, 이취가 없고 고유의 향미가 있는 갈색의 분말	
	중금속 (mg/kg)	납	2.0이하	0.2362
		총비소	2.0이하	0.2431
		카드뮴	1.0이하	0.0907
		총수은	1.0이하	불검출
	미생물	대장균군	음성	음성
		세균수(cfu/g)	-	
곰팡이 독소	총아플라톡신	15.0 ug/kg	불검출	
규격 미설정 항목	잔류농약	58종	Azoxystrobin 0.0016 mg/kg, Thiamethoxam 0.0279 mg/kg, Flubendiamide 0.0011 mg/kg 제외 불검출되었으며, 검출된 3가지 농약 잔류 기준치 이하로 문제 없음	







## 제 5 절 전임상(in vitro, in vivo) 실험을 통한 효과 검증

### 1. 개별 및 복합 추출물의 cell-based assay를 통한 항비만 효과 검증

#### 가. 개별 추출물의 지방 합성 억제 효과

##### (1) 고추씨 추출물의 지방 합성 억제 효과

###### (가) 4°C 고추씨 물추출물

- 선행연구에서 추출물 정제 관련 전문가와 회의를 통해 일반적인 실온 추출 대신 고추의 유효물질로 알려진 캡사이신 관련 물질의 추출이 가능한 4°C 추출을 선택하여 세포 및 동물을 이용한 스크리닝을 실시하여 유의한 효과를 얻었으므로 먼저 4°C 고추씨 추출물을 이용 기전연구를 실시함

###### ① 4°C 고추씨 물추출물의 세포 독성과 지방 합성 억제 효과

- 실험 결과, 4°C 고추씨 추출물은 세포 독성이 관찰되지 않았으며, 대조군에 비하여 유의적으로 지방 합성 억제 효과가 나타남(Fig 42)

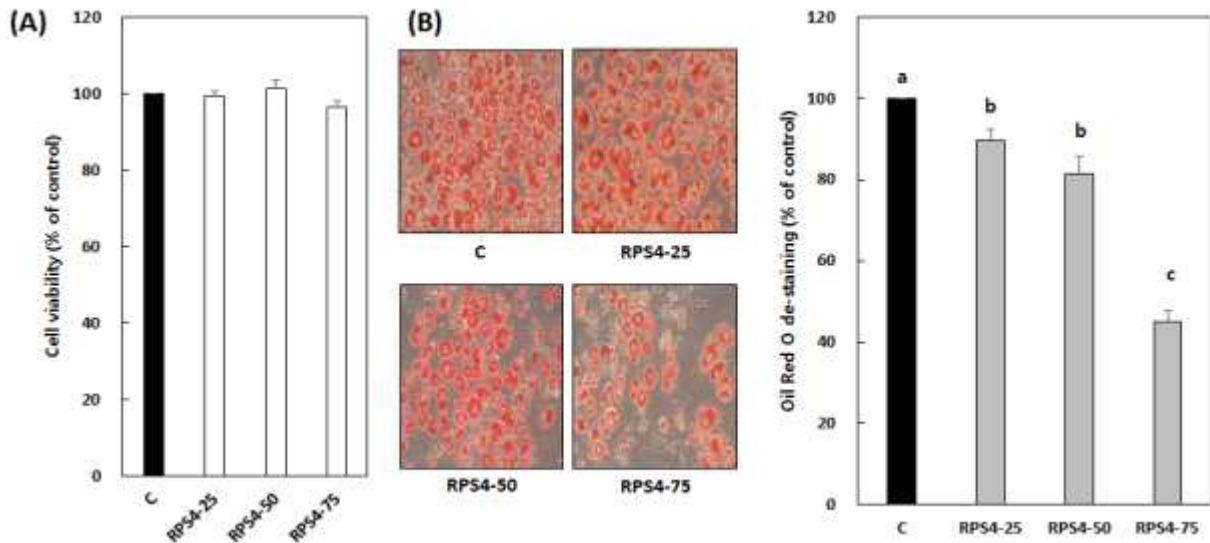


Fig 42. Effect of red pepper seed extracts (4°C) on viability (A) and differentiation (B) of 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of red pepper seed extracts. C: PBS, RPS4-25: 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of red pepper seed extract at 4  $^{\circ}\text{C}$ , RPS4-50: 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of red pepper seed extract at 4  $^{\circ}\text{C}$ , RPS4-75: 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of red pepper seed extract at 4  $^{\circ}\text{C}$ . Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

###### ② 4°C 고추씨 물추출물의 지방 합성 관련 단백질 발현 측정

- AMP-activated protein kinase (AMPK)는 serine/threonine kinase로서 지질과 포도당 대사의 조절인자로 알려져 있으며 당뇨와 비만에 중요한 조절작용을 함. AMPK는 세포 내 에너지 소모 시 증가되는 AMP에 의해 활성화되어 이화작용(catabolism)을 유도하여 에너지 항상성(homeostasis)을 유지하는데 핵심적인 역할을 함
- AMPK는 지방세포 분화의 핵심적인 전사인자인 PPAR  $\gamma$ 와 C/EBP  $\alpha$ 의 발현을 조절하며

- SREBP와 그 하위인자인 FAS, aP2 및 ACC의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있음
- 실험 결과, 대조군에 비하여 4°C 고추씨 추출물은 유의적으로 p-AMPK 단백질 발현량이 증가하였으며, AMPK 단백질 발현량은 차이가 없었음(Fig. 43)

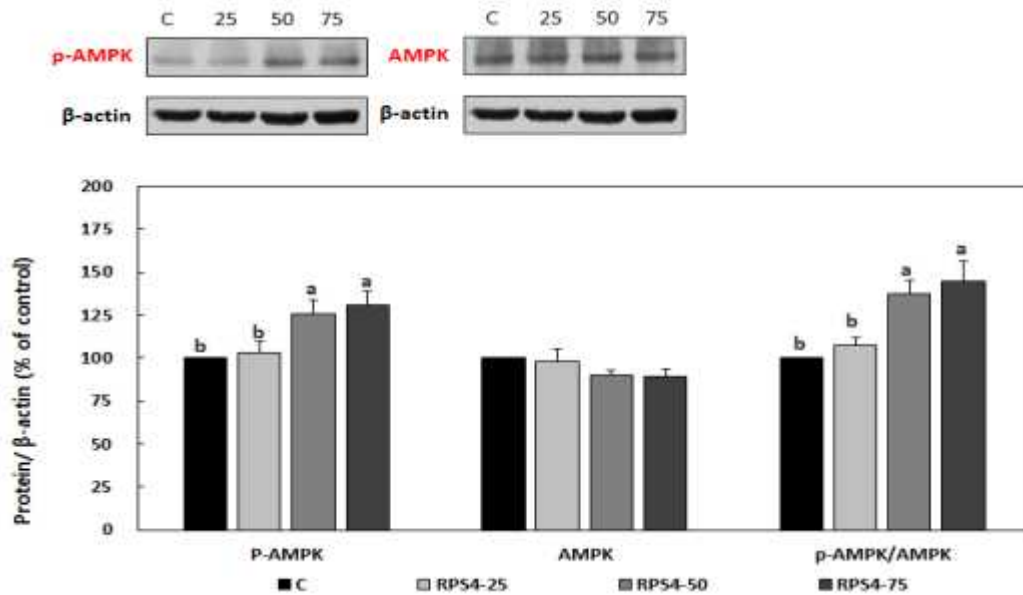


Fig 43. Effect of red pepper seed extracts(4°C) on AMPK and p-AMPK expression in 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of fallen pear extracts. Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting to detect AMPK and p-AMPK. C: PBS, RPS4-25: 25 µg/ml of red pepper seed extract at 4 °C , RPS4-50: 50 µg/ml of red pepper seed extract at 4 °C , RPS4-75: 75 µg/ml of red pepper seed extract at 4 °C. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05)

- C/EBP family와 PPAR  $\gamma$  는 호르몬에 의해 지방합성이 유도되는 과정에서 작용하는 전사인자임. Nuclear receptor superfamily에 속하는 PPAR  $\gamma$  는 지방합성을 총괄적으로 조절하는 역할을 하며 지방세포로 분화된 상태를 유지하는데 필수적인 인자이고 C/EBP  $\beta$  는 PPAR  $\gamma$  발현을 촉진시켜 지방전구세포의 초기 분화과정에서 중요한 역할을 하는 한편, C/EBP  $\alpha$  는 PPAR  $\gamma$  와의 강한 상승 작용을 통해 지방전구세포의 말기 분화 과정을 촉진함
- SREBPs는 지방산과 콜레스테롤의 생합성 경로에 관련되는 효소를 활성화하여 간에서 지방산과 콜레스테롤 합성을 조절하는 중요한 전사활성인자임. SREBP-1a와 SREBP-1c는 주로 지방산과 중성지방의 합성에 관여하고 있고 SREBP-2는 콜레스테롤 대사에 관여하는 것으로 알려져 있음
- 또한, 이들 전사인자들의 하위인자인 fatty acid synthesis (FAS)는 acetyl-CoA와 malonyl-CoA로부터 long chain fatty acid를 생성하게 하는 효소임
- 실험 결과, 대조군에 비하여 4°C 고추씨 추출물은 유의적으로 PPAR- $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$ , SREBP-1c, FAS, p-ACC, ACC 단백질 발현량이 감소함(Fig. 44)

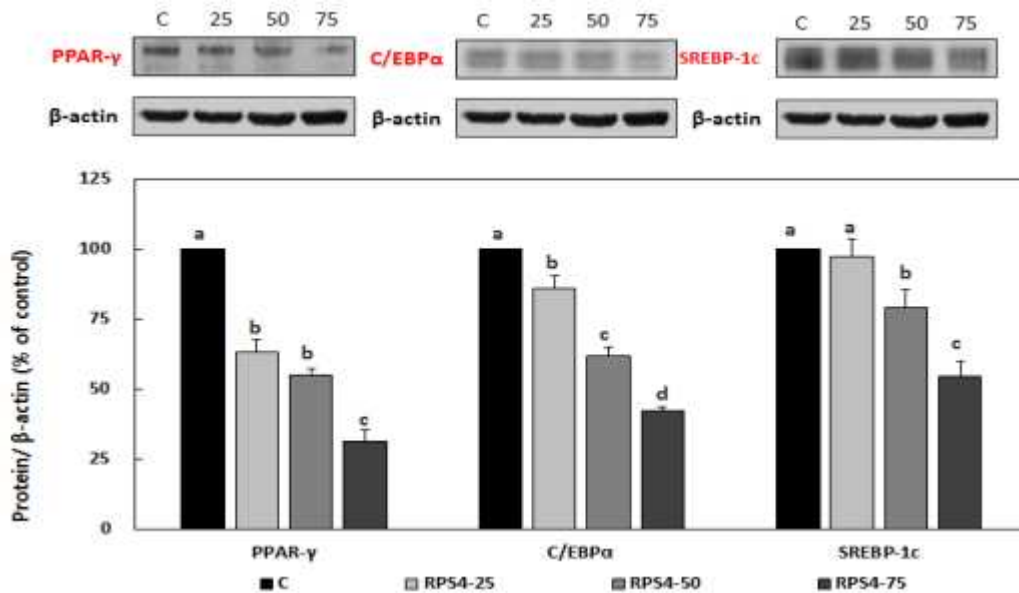


Fig 44. Effect of red pepper seed extracts (4°C) on PPAR- $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$  and SREBP-1c expression in 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of fallen pear extracts. Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting to detect PPAR- $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$  and SREBP-1c. C: PBS, RPS4-25: 25  $\mu\text{g/ml}$  of red pepper seed extract at 4 °C , RPS4-50: 50  $\mu\text{g/ml}$  of red pepper seed extract at 4 °C , RPS4-75: 75  $\mu\text{g/ml}$  of red pepper seed extract at 4 °C. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

### ③ 4°C 고추씨 물추출물의 세포 사멸 효과 측정

- 세포의 죽음은 크게 세포사멸 (apoptosis)와 세포괴사(necrosis)로 구분되며, 그 중 세포사멸은 세포 내부의 신호에 따른 여러 단백질 활성의 조절과 유전자의 발현을 통하여 일어나는 능동적인 세포 예정사로 알려져 있음
- 고추씨 추출물의 세포 사멸을 측정한 결과, 대조군에 비해 농도 의존적으로 증가함(Fig. 45)

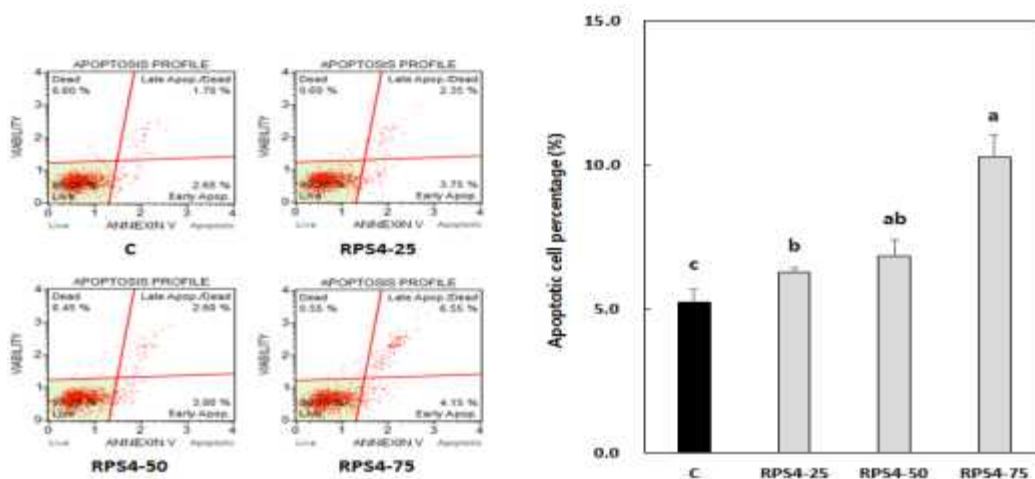


Fig 45. Effect of red pepper seed extracts (4°C) on apoptosis in 3T3-L1 adipocytes.

C: PBS, RPS4-25: 25  $\mu\text{g/ml}$  of red pepper seed extract at 4 °C , RPS4-50: 50  $\mu\text{g/ml}$  of red pepper seed extract at 4 °C , RPS4-75: 75  $\mu\text{g/ml}$  of red pepper seed extract at 4 °C. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

④ 4°C 고추씨 물추출물의 세포 사멸 관련 단백질 발현 측정

- 세포사멸과 관련된 유전자는 Bcl-2 family 중 세포사멸 유도 유전자인 Bax, Bad, Bak, Bcl-xS 등과 이를 억제하는 유전자인 Bcl-x, Bcl-xL 등이 존재하여 길항적으로 조절됨
- 세포사멸 관련 메커니즘 구명을 위해 Bcl-2 family 유전자 발현을 특정한 결과, 고추씨 75 µg/ml 농도는 대조군에 비해 pro-apoptotic 인자인 Bak, Bad, Bax는 유의적으로 증가하였고, anti-apoptotic 인자인 Bcl-2는 유의적으로 감소함(Fig. 46)

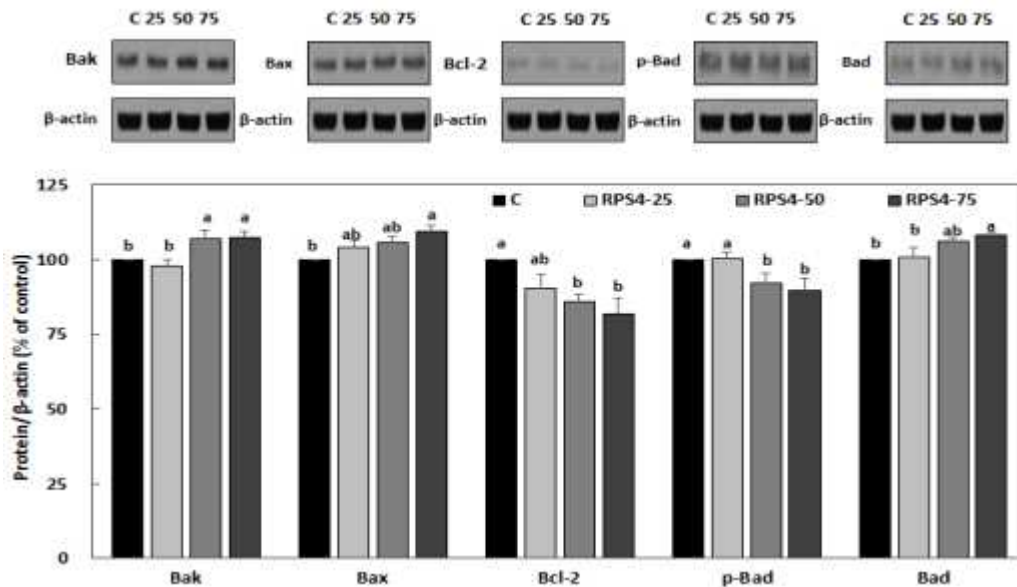


Fig 46. Effect of red pepper seed extracts (4°C) on Bak, Bax, Bcl-2, p-Bad, and Bad expression in 3T3-L1 adipocytes.

C: PBS, RPS4-25: 25 µg/ml of red pepper seed extract at 4 °C , RPS4-50: 50 µg/ml of red pepper seed extract at 4 °C , RPS4-75: 75 µg/ml of red pepper seed extract at 4 °C. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05)

- 또한, 세포사멸의 지표로 사용되는 Bcl-2와 Bax, p-Bad와 Bad의 비율을 구해본 결과, 고추씨 추출물이 대조군에 비해 유의적으로 감소함(Fig. 47)



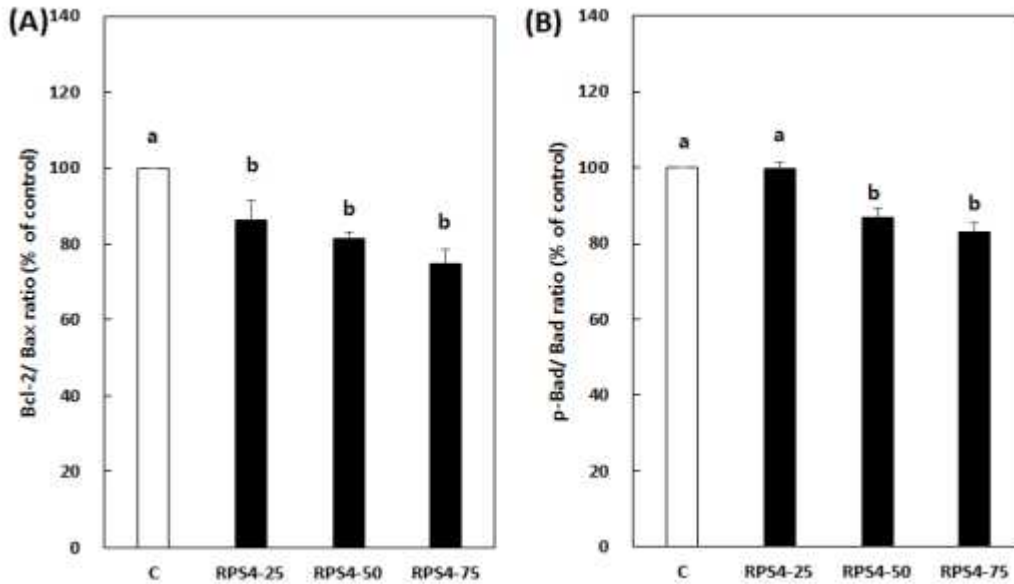


Fig 47. Effect of red pepper seed extracts (4°C) on Bcl-2/Bax and p-Bad/Bad ratio in 3T3-L1 adipocytes.

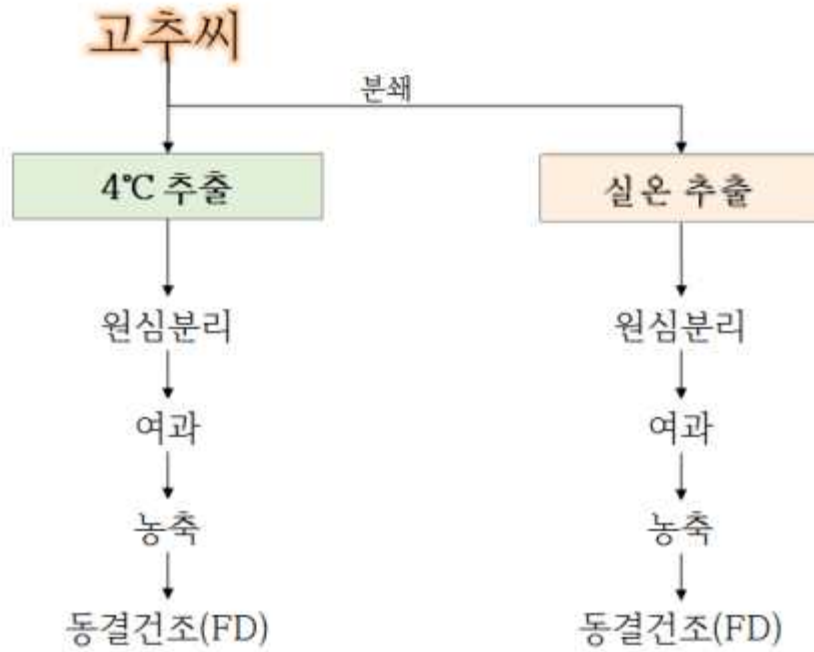
C: PBS, RPS4-25: 25 µg/ml of red pepper seed extract at 4 °C , RPS4-50: 50 µg/ml of red pepper seed extract at 4 °C , RPS4-75: 75 µg/ml of red pepper seed extract at 4 °C. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05)

- 실험결과, 고추씨 4°C 추출물이 효과적으로 지방합성 억제 효과가 있는 것을 확인 한 후, HPLC를 통해 캡사이신을 측정하였으나, 기존 고추씨의 캡사이신 함유량보다 낮게 함유하고 있는 것을 확인하였음
- 그러나, 4°C 추출의 비용부담을 줄여 가격 경쟁력 있는 제품을 개발하기 위하여 추출 온도를 달리하여 지방합성 억제 효과를 측정하였음

(나) 추출 온도에 따른 지방 합성 억제 효과

① 추출 온도에 따른 추출물 제조

- 고추씨 추출물은 주관기관에서 제공하였으며, 이는 추출과정에 별도의 추가 공정없이 실온(1°C ~ 35°C) 조건에서 추출하므로 생산기반 시설의 추가적인 비용(온도 조절 및 유지 비용) 없이 제조 가능함
- 따라서 본 연구에서는 4°C 추출물과 실온 추출물을 이용하여 지방 합성 억제 효과를 측정함



② 추출 온도에 따른 지방합성 억제 효과

- 실험 결과, 대조군이 비해 고추씨 추출물(실온)과 4°C 고추씨 추출물이 유의적으로 지방합성을 억제하였으며, 4°C 고추씨 추출물에 비해 고추씨 추출물(실온)이 유의적으로 지방 합성을 억제하였음(Fig. 48)

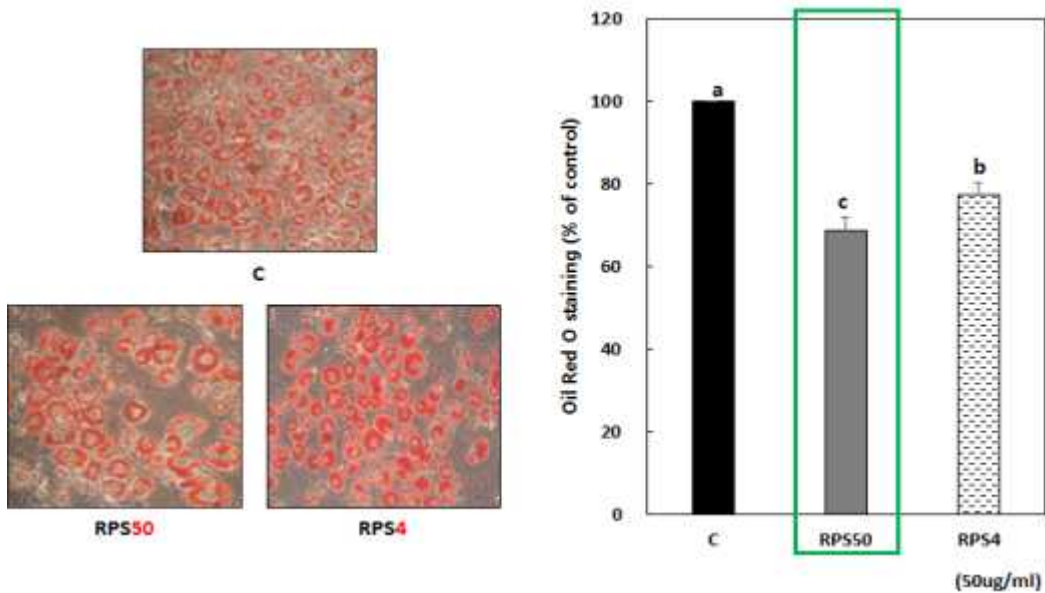


Fig 48. Effect of red pepper seed extracts prepared at different temperature on differentiation in 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of red pepper seed extracts. C: PBS, RP50: 50  $\mu$ g/ml of red pepper seed extract. RP4: 50  $\mu$ g/ml of red pepper seed extract at 4  $^{\circ}$ C. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )



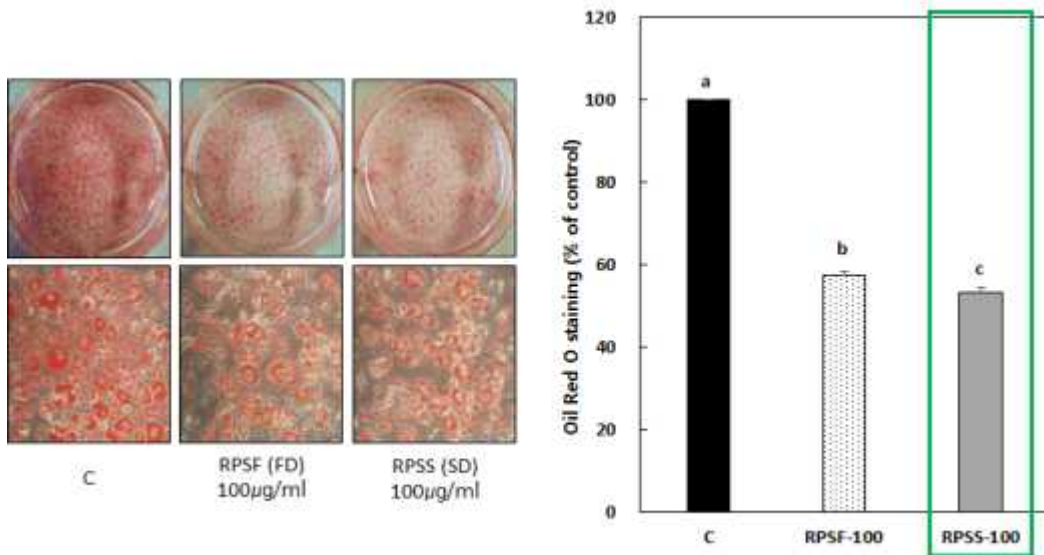
- 국내에서는 4°C 추출물을 대량생산할 수 있는 기계적 기반이 갖추어져 있지 않으므로, 실온추출물을 선택하여 실험을 진행함

(다) 고추씨 물 추출물의 건조 방법에 따른 지방 합성 억제 효과

- 추출물의 건조 방법에는 동결건조와 분무건조 방법이 있으며, 동결건조는 건조 시 첨가물(덱스트린등: 칼로리) 없이 건조할 수 있는 장점이 있으나, 생산시설이 많지 않아 단가가 비싼 단점을 가지고 있으며, 이에 반해 분무건조는 건조 시 첨가물이 필요할 수 있으나, 단가가 저렴하며 생산시설 이용이 쉬운 편임. 산업적인 측면에서는 건조 시 첨가물 문제만 해결된다면 분무건조를 사용하는 것이 더 큰 이점이 있음



- 따라서 본 연구에서도 추출물의 건조 방법을 달리하여 동결건조 및 분무건조 추출물의 지방합성 억제 효과를 측정하였음
- 실험 결과, 대조군에 비해 동결건조와 분무건조 고추씨 추출물이 유의적으로 지방합성을 억제 하였으며, 동결건조에 비해 분무건조 고추씨 추출물이 유의적으로 지방합성을 억제하였음(Fig. 49)



**Fig 49. Effect of red pepper seed extracts prepared by different drying methods on differentiation in 3T3-L1 adipocytes.**

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of red pepper seed extracts. C: PBS, RPSF-100: 100 µg/ml of freeze-dried pepper seed extract, RPSS-100: 100 µg/ml of spray-dried pepper seed extract at 60 °C. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- 따라서, 본 연구에서는 실온에서 추출하여 분무건조한 고추씨 추출물(고추씨 추출물(분무건조)을 체지방 감소에 도움이 되는 건기식 소재로 개발하기로 함

(라) 고추씨 물추출물(분무건조)의 지방합성 억제효과

① 고추씨 추출물(분무건조)의 세포 독성과 지방 합성 억제 효과

- 실험 결과, 고추씨 추출물(분무건조) 200 µg/ml 농도에서 약 70%의 세포 생존율을 나타냈으므로, 이를 제외하고 지방 합성 억제 효과를 측정함
- 지방 합성 억제 효과 측정 결과, 대조군에 비하여 농도 의존적으로 지방 합성이 억제됨(Fig. 50)

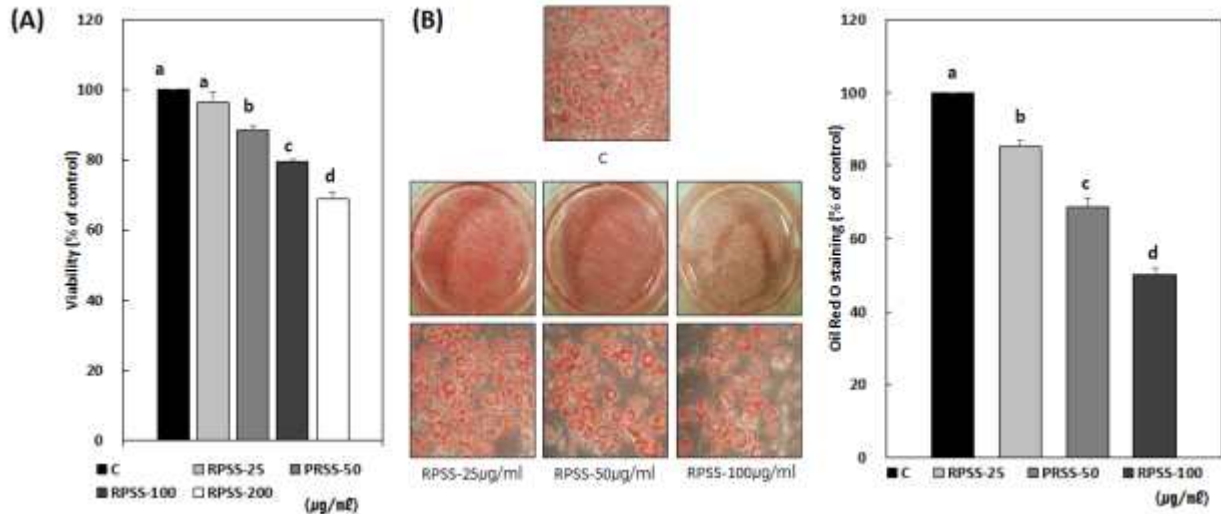


Fig 50. Effect of red pepper seed extracts on viability (A) and differentiation (B) in 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of red pepper seed extracts. C: PBS, RPSS-25: 25 µg/ml of spray-dried pepper seed extract, RPSS-50: 50 µg/ml of spray-dried pepper seed extract, RPSS-100: 100 µg/ml of spray-dried pepper seed extract, RPSS-200: 200 µg/ml of spray-dried pepper seed extract. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

② 고추씨 추출물(분무건조)의 지방 합성 관련 단백질 발현 측정

- 실험 결과, 대조군에 비하여 고추씨 추출물(분무건조)은 유의적으로 PPAR- $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$ , SREBP-1c, FAS, p-ACC, ACC 단백질 발현량이 감소함(Fig. 51, 52, 53)

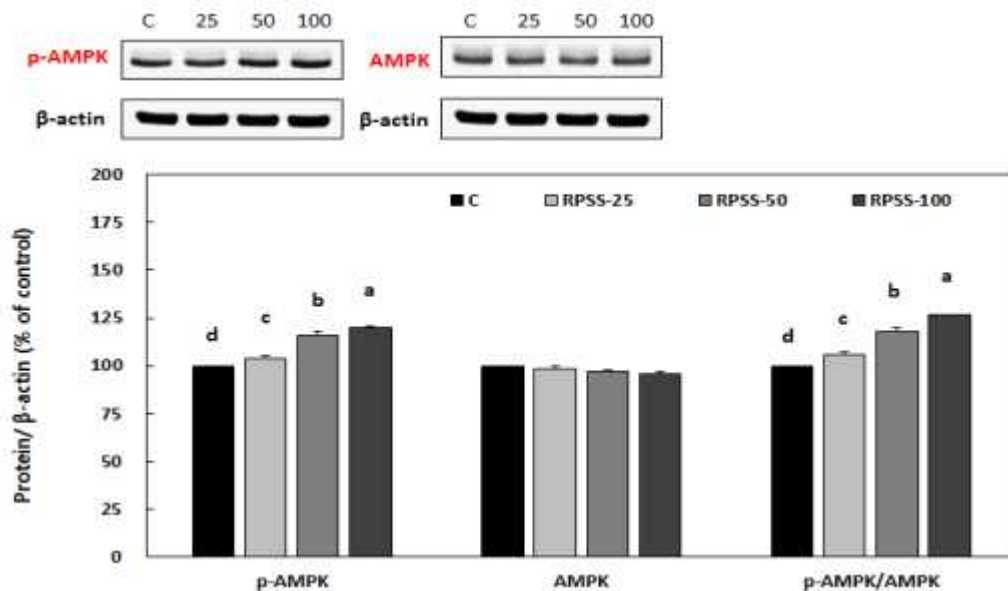


Fig 51. Effect of red pepper seed extracts on AMPK and p-AMPK expression in 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of red pepper seed extracts. Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting to detect AMPK and p-AMPK. C: PBS,

RPSS-25: 25  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract, RPSS-50: 50  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract, RPSS-100: 100  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

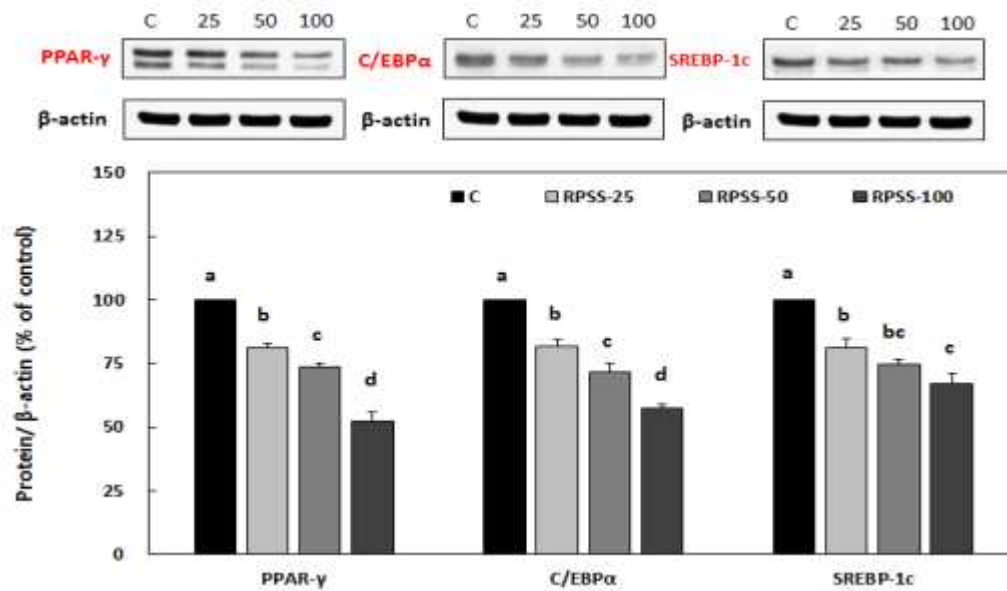


Fig 52. Effect of red pepper seed extracts on PPAR- $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$  and SREBP-1c expression in 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of red pepper seed extracts. Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting to detect PPAR- $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$  and SREBP-1c. C: PBS, RPSS-25: 25  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract, RPSS-50: 50  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract, RPSS-100: 100  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

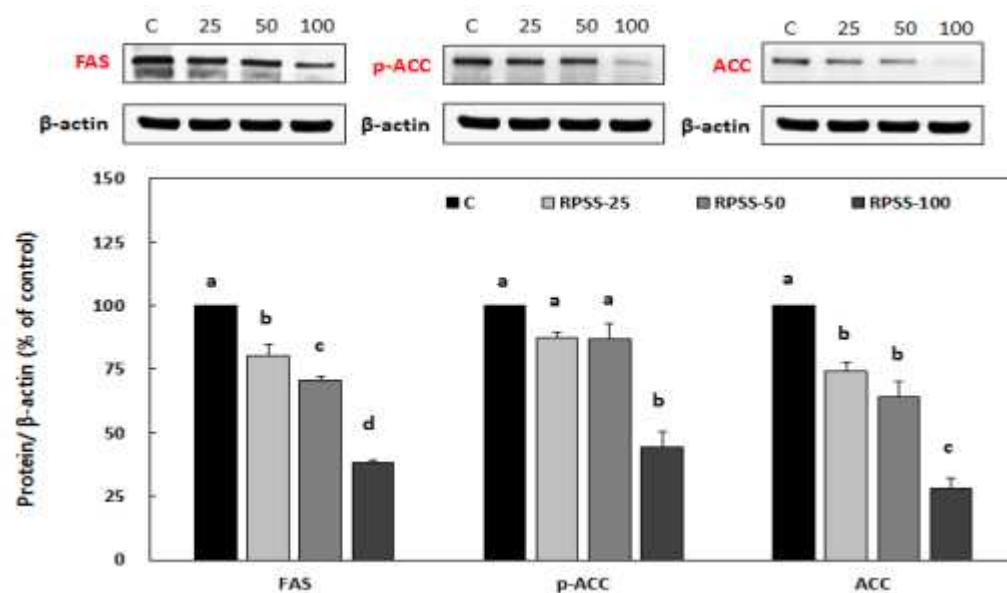


Fig 53. Effect of red pepper seed extracts on FAS, p-ACC and ACC expression in 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of red pepper seed

extracts. Cell lysates were prepared and subjected to Western blotting to detect FAS, p-ACC and ACC. C: PBS, RPSS-25: 25  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract, RPSS-50: 50  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract, RPSS-100: 100  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

- 본 연구에서는 최적 고추씨 추출물을 선정하기 위하여 온도, 건조방법에 따른 지방합성 억제 효과를 측정 한 결과, 고추씨 추출물(실온추출, 분무건조)을 최적 소재로 선정하고 이를 이용하여 복합 기능성 평가 및 동물실험을 진행함

(마) 3T3-L1 cell에서 항비만 기작의 구명

- ① 고추씨 추출물의 지방세포 분화 및 지방생성 관련 유전자 발현에 대한 영향 검증
  - 1차 년도에 전구 지방세포에 고추씨 추출물 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도를 처리하여 지방 합성 억제 효과를 구명하였으며, 지방세포 분화 및 지방생성에 관여하는 단백질 발현을 측정함
  - 따라서, 2차 년도에는 고추씨 추출물이 분화의 어느 단계에 영향을 주는지 알아보기 위해 Oil Red O staining에서 가장 효과가 좋았던 고추씨 추출물 100  $\mu\text{g/ml}$  농도를 분화 과정 중 기간별로 처리함
  - 실험 결과, 분화 첫 날 부터 처리한 0-2, 0-4, 0-6, 0-8 day에 해당하는 기간에서 효과적으로 지방분화를 억제시키는 것을 확인하였음(Fig. 54).

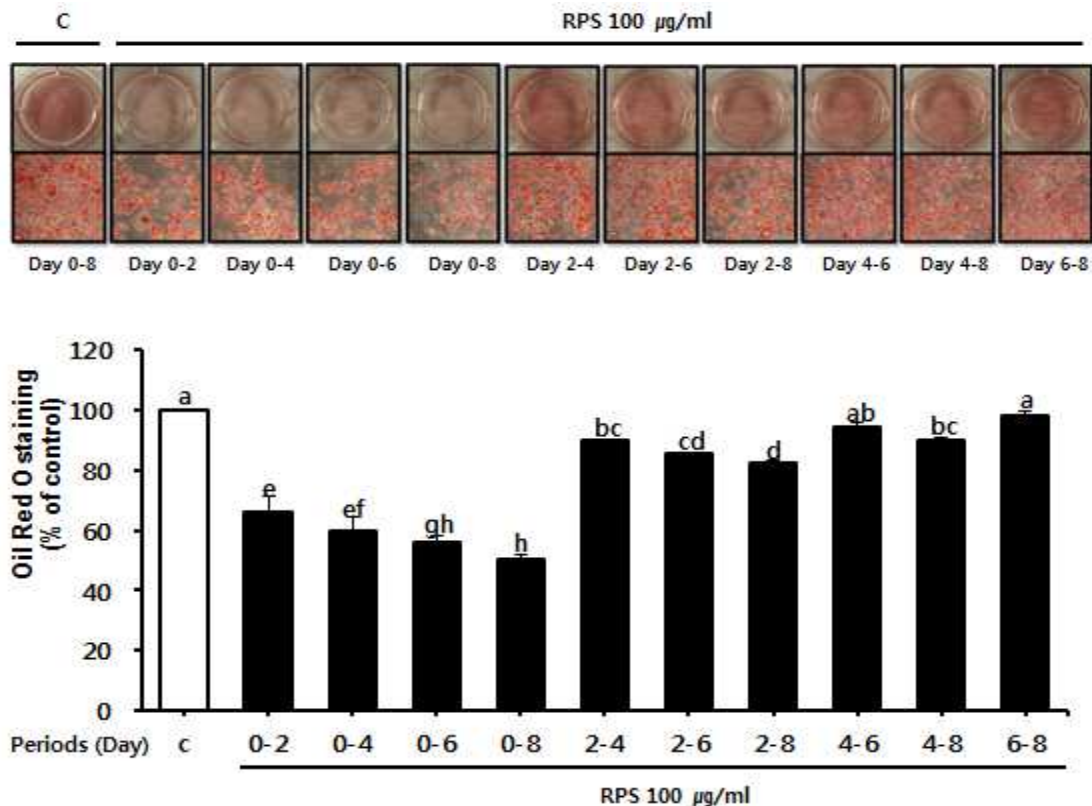


Fig 54. Effect of red pepper seed extract during the stage of adipogenesis

3T3-L1 pre-adipocytes differentiated into mature adipocytes in the presence of 100  $\mu\text{g/ml}$  of red pepper seed water extract for the indicated time periods. Values are mean $\pm$ SE. Means with the same letter do not differ significantly based on one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- 전구지방세포에서 분화가 유도되어 cAMP 같은 adipogenic signal에 접하게 되면 먼저 전사인자 C/EBP  $\beta$ 와  $\delta$ 의 발현이 유도되고 이들이 지방 세포 분화의 주요 조절자인 PPAR- $\gamma$ 의 발현을 유도하여 분화를 진행시킴
- 분화 초기단계에 관여하는 C/EBP  $\beta$ , C/EBP  $\delta$ 의 단백질 발현 측정결과, 고추씨 추출물이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음(Fig. 55)

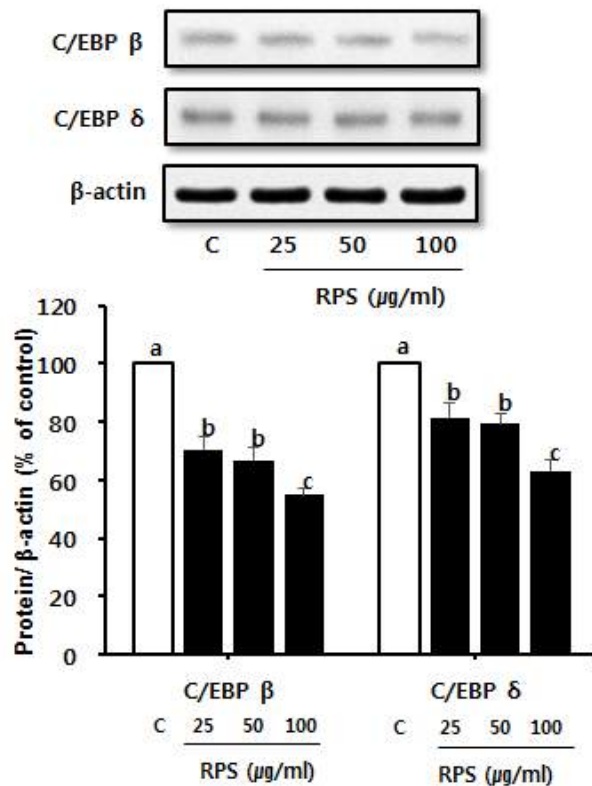


Fig 55. Effect of red pepper seed extract on the differentiation transcription factor (C/EBP  $\beta$  and C/EBP  $\delta$ ) expression in 3T3-L1 adipocytes

3T3-L1 pre-adipocytes were differentiated into mature adipocytes in the presence of 100  $\mu\text{g/ml}$  of red pepper seed water extract for the indicated time periods. Values are mean $\pm$ SE. Means with the same letter do not differ significantly based on one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

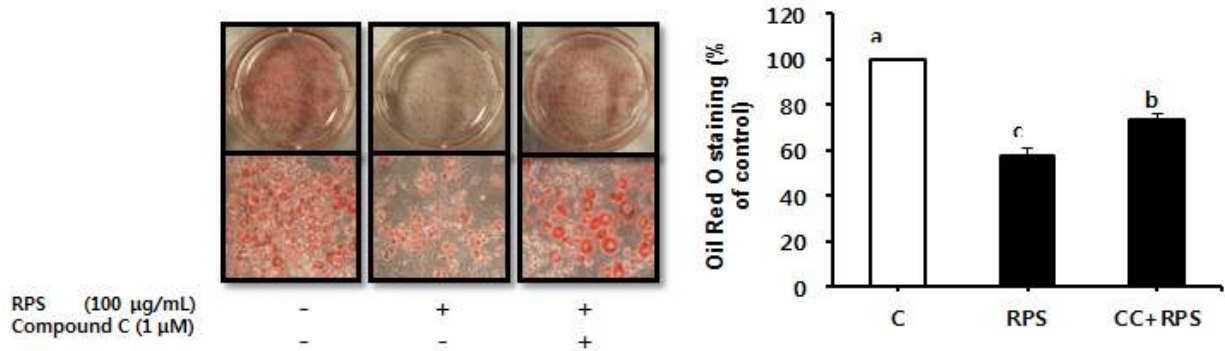
- 따라서 고추씨 추출물은 분화초기 단계에 관여하여 지방세포의 분화를 억제하는 것으로 사료됨

② 고추씨 추출물의 에너지 대사 조절에 관여하는 유전자 발현에 대한 영향 검증

- 1차 년도에 전구 지방세포에 고추씨 추출물 25, 50, 100  $\mu\text{g/ml}$  농도를 처리하여 AMPK 발현을 측정 한 결과, 고추씨 추출물이 AMPK 활성화에 관여한다는 것을 예상할 수 있었음



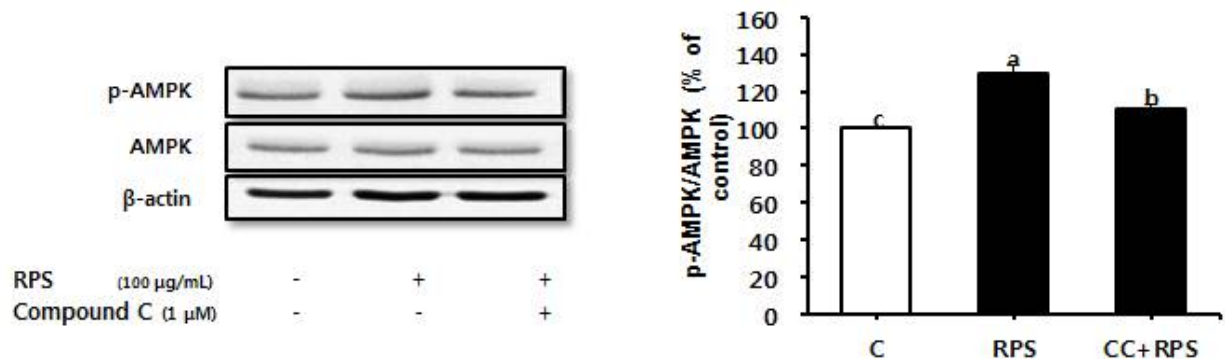
- 따라서, 2차 년도에는 고추씨 추출물이 AMPK 경로에 미치는 영향을 알아보기 위해 AMPK inhibitor인 compound C를 처리한 후 고추씨 추출물 100 µg/ml 농도를 처리함
- Oil Red O staining 실험 결과, compound C를 처리하였을 때 고추씨 추출물의 지질 축적 억제 효과가 상쇄되는 것을 확인하였음(Fig. 56)



**Fig 56. Effect of compound C on differentiation of 3T3-L1 adipocyte treated with red pepper seed extract**

3T3-L1 preadipocytes were pre-treated the presence or absence of 1 µM compound C in 30 minutes and treated the red pepper seed water extract with hormonal cocktail for eight days. Values are mean±SE. Means with the same letter do not differ significantly based on one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- p-AMPK/AMPK 단백질 발현 측정결과, 고추씨 추출물에 의해 증가된 p-AMPK/AMPK 비율이 compound C를 함께 처리한 군에서는 유의적으로 감소함(Fig. 57)



**Fig 57. Effect of compound C on p-AMPK/AMPK expression of 3T3-L1 adipocytes treated with red pepper seed extract**

3T3-L1 preadipocytes were pre-treated the presence or absence of 1 µM compound C in 30 minutes and treated the red pepper seed water extract with hormonal cocktail for eight days. Values are mean±SE. Means with the same letter do not differ significantly based on one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ )

- AMPK의 하위인자인 PPAR-γ, C/EBP α, SREBP-1c, FAS, ACC의 단백질 발현 측정 결과, p-AMPK/AMPK 비율과 같은 경향을 나타냄(Fig. 58, 59)

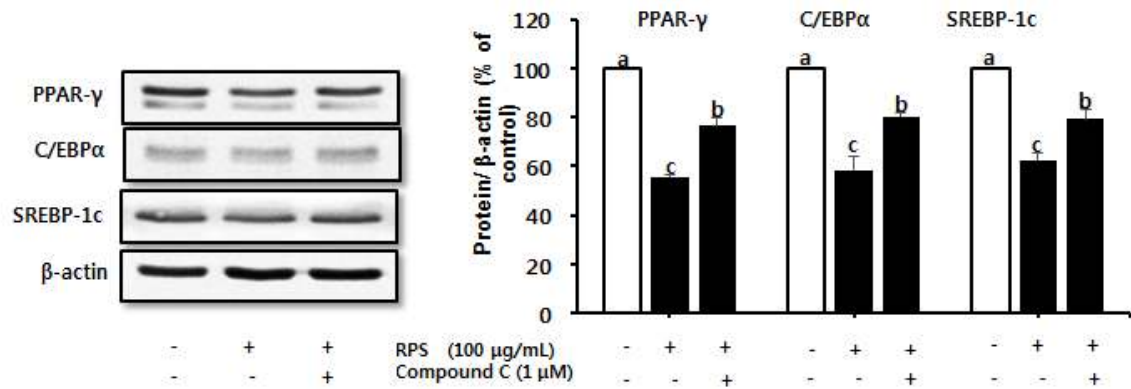


Fig 58. Effect of compound C on differentiation transcription factors (PPAR- $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , and SREBP-1c) expression of 3T3-L1 adipocytes treated with red pepper seed extract

3T3-L1 preadipocytes were pre-treated the presence or absence of 1 $\mu$ M compound C in 30 minutes and treated the red pepper seed water extract with hormonal cocktail for eight days. Values are mean $\pm$ SE. Means with the same letter do not differ significantly based on one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test ( $p < .05$ )

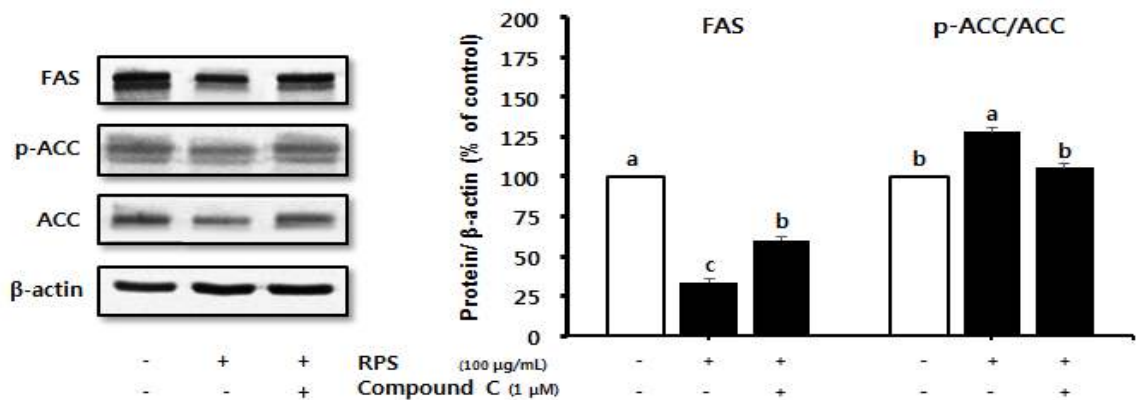


Fig 59. Effect of compound C on differentiation transcription factors (PPAR- $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , and SREBP-1c) expression of 3T3-L1 adipocytes treated with red pepper seed extract

3T3-L1 preadipocytes were pre-treated the presence or absence of 1 $\mu$ M compound C in 30 minutes and treated the red pepper seed water extract with hormonal cocktail for eight days. Values are mean $\pm$ SE. Means with the same letter do not differ significantly based on one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test ( $p < .05$ )

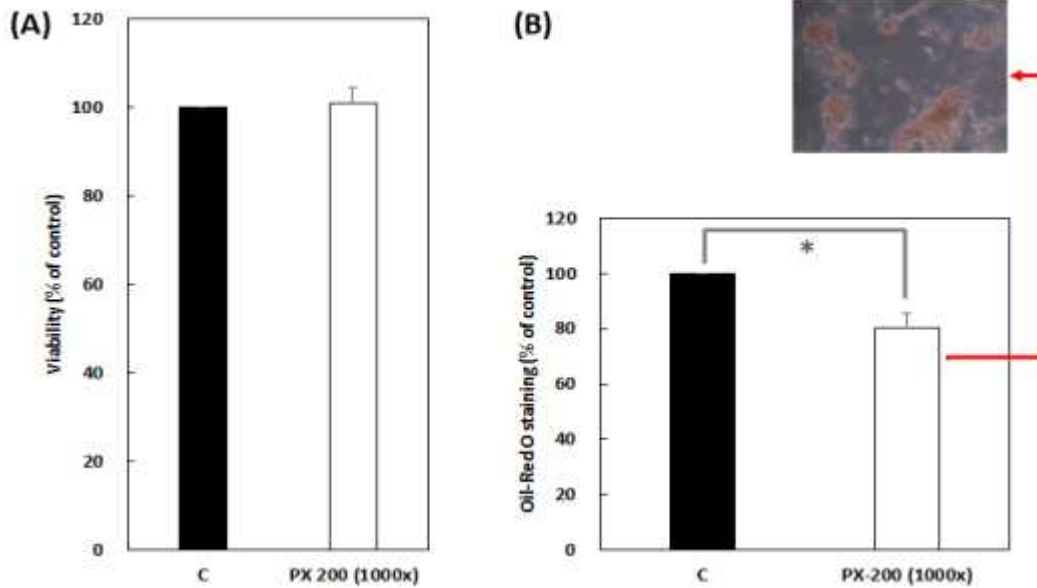
- 따라서 고추씨 추출물이 AMPK 경로를 통해 지방생성을 억제함을 구명함

## (2) 파인엑솔의 지방합성 억제 효과

(가) 파인엑솔 농축액 (1000X)의 세포 독성과 지방 합성 억제 효과

- 실험 결과, 파인엑솔 1000x 농축액은 세포 독성은 관찰할 수 없었으며, 지방합성 억제 효과가 유의적으로 나타났으나, 용해도 문제가 발생함(Fig. 60)



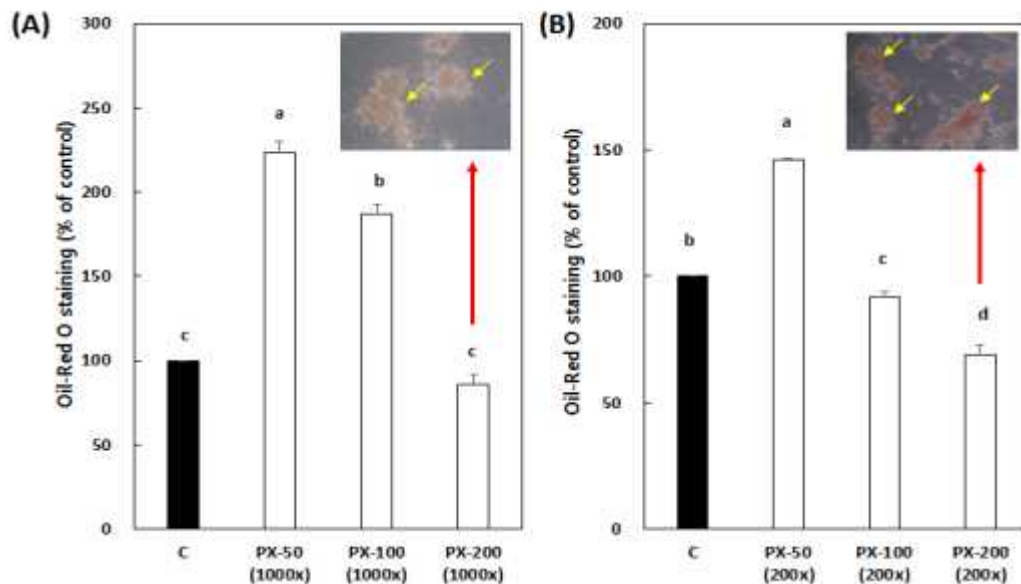


**Fig 60. Effect of PineXol on viability (A) and differentiation (B) in 3T3-L1 adipocytes.**

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of PineXol. C: PBS, PX 200 (1000x): 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of PineXol (stock solution 1 mg/ml). Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

(나) 파인엑솔 농축액 제조 방법에 따른 지방합성 억제 효과

- 파인엑솔 농축액을 1000x 와 200x로 만들어서 측정함
- 측정 결과, 200x 농축액이 1000x 농축액보다 지방 합성 억제 효과가 더 큰 것을 관찰하였고, 용해도 문제도 200x 농축액이 1000x 농축액에 비해 줄어들었음(Fig. 61)



**Fig 61. Effect of various concentration of PineXol on differentiation in 3T3-L1 adipocytes.**

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of PineXol. C: PBS, PX 50 (1000x): 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of PineXol (stock solution 1 mg/ml), PX 100 (1000x): 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of PineXol (stock solution 1 mg/ml),

PX 200 (1000x): 200 µg/ml of PineXol (stock solution 1 mg/ml), PX 50 (200x): 50 µg/ml of PineXol (stock solution 10 mg/ml), PX 100 (200x): 100 µg/ml of PineXol (stock solution 10 mg/ml), PX 200 (200x): 200 µg/ml of PineXol (stock solution 10 mg/ml). Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

(다) 파인엑솔 처리 시간에 따른 지방합성 억제 효과

- 기존 실험에서는 총 8일 동안 파인엑솔을 처리하나, 용해도 문제 해결을 위해 처리시간을 달리하여 지방 합성 억제 효과를 비교함
- 파인엑솔은 200 µg/ml 농도로 처리한 결과, 3일 이상 처리 시에는 세포사멸로 인해 단백질량이 감소하는 경향을 보임. 2~4일 처리 시 대조군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 관찰 할 수 있었음. 따라서 0-2일 처리군을 최적 처리 시간으로 선정하고, 농도별 실험을 진행하고 있음(Fig. 62)

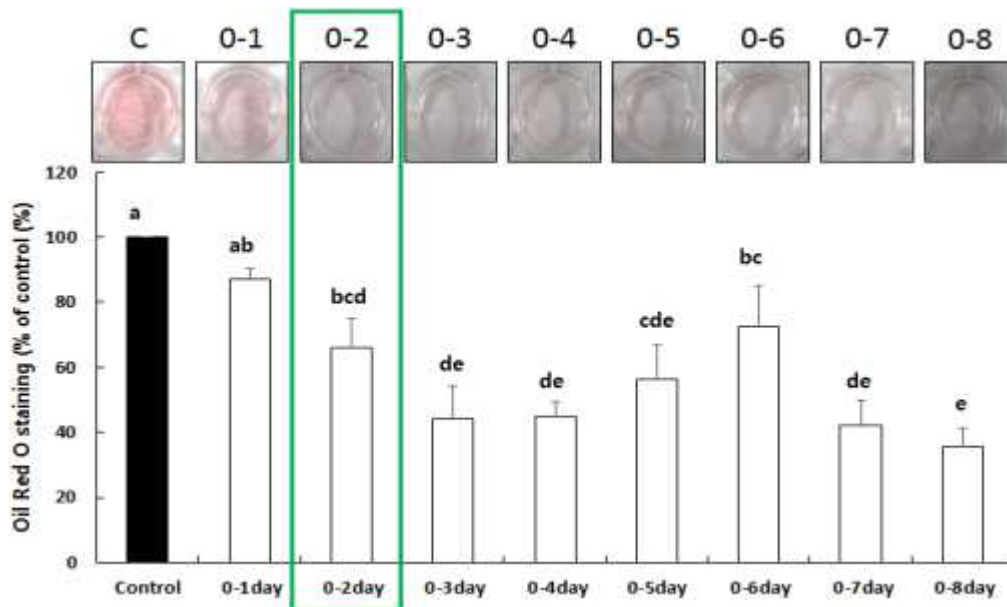
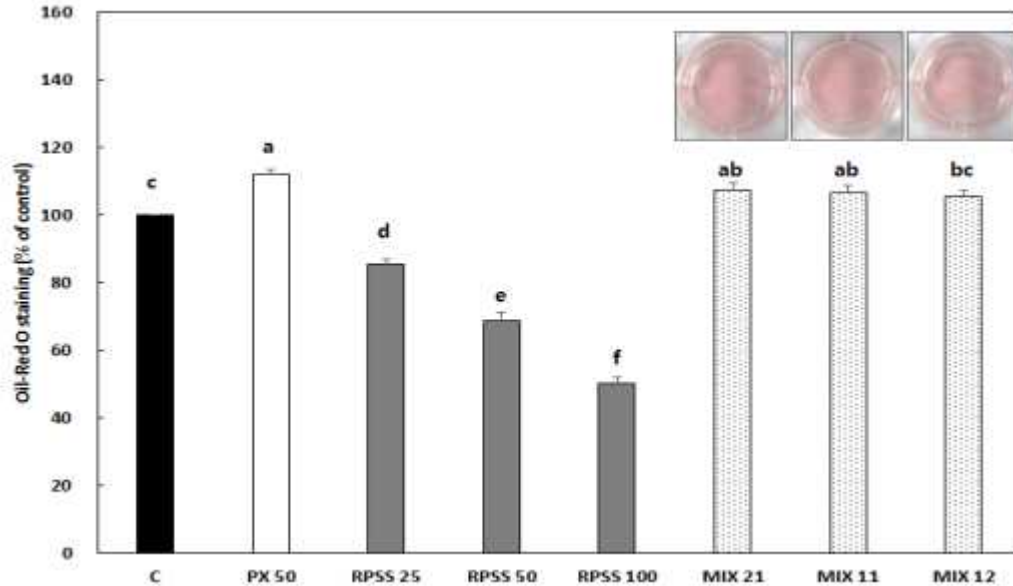


Fig 62. Effect of PineXol treatment time on differentiation in 3T3-L1 adipocytes.

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of PineXol. C: PBS, 0-1day: 200 µg/ml of PineXol for 1 day, 0-2day: 200 µg/ml of PineXol for 2 day, 0-3day: 200 µg/ml of PineXol for 3 day, 0-4day: 200 µg/ml of PineXol for 4 day, 0-5day: 200 µg/ml of PineXol for 5 day, 0-6day: 200 µg/ml of PineXol for 6 day, 0-7day: 200 µg/ml of PineXol for 7 day, 0-8day: 200 µg/ml of PineXol for 8 day. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

나. 복합 추출물의 지방 합성 억제 효과

- 고추씨 추출물과 파인엑솔 복합군의 시너지 효과를 측정하기 위해 파인엑솔: 고추씨 추출물=2:1, 1:1, 1:2로 실험을 진행함
- 실험군: 2:1 = 파인엑솔 50 µg/ml + 고추씨 추출물 25 µg/ml , 1:1 = 파인엑솔 50 µg/ml + 고추씨 추출물 50 µg/ml , 1:2 = 파인엑솔 50 µg/ml + 고추씨 추출물 100 µg/ml
- 실험 결과, 복합군에서 지방 합성 억제 효과가 관찰 되지 않음(Fig. 63)



**Fig 63. Effect of mixture of RBP and Px on differentiation in 3T3-L1 adipocytes.**

3T3-L1 cells were differentiated with hormonal cocktail for eight days in absence or presence of mixture. C: PBS, PX 50 : 50  $\mu\text{g/ml}$  of PineXol, RPSS-25: 25  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract, RPSS-50: 50  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract, RPSS-100: 100  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract, MIX 21: 50  $\mu\text{g/ml}$  of PineXol + 25  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract, MIX 11: 50  $\mu\text{g/ml}$  of PineXol + 50  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract, MIX 12: 50  $\mu\text{g/ml}$  of PineXol + 100  $\mu\text{g/ml}$  of spray-dried pepper seed extract. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

## 2. 고지방식이 유도 비만 동물모델을 이용한 개별 및 복합 추출물의 in vivo 항비만, 인슐린 저항성 억제 효과 검증

- 세포 실험을 통해 선별된 고추씨 추출물(실온추출, 분무건조)과 파인엑셀을 이용하여 동물 실험을 진행하였음
- 고지방식이 투여로 인한 비만 동물 모델 확립을 위해 대조군은 기본식이와 고지방식이 섭취군으로 나누어 사육하였으며, 추출물 투여군은 고지방식이 섭취를 기본으로 하였음
- 고추씨 추출물은 선행연구를 통해 100, 200, 400 mg/kg을, 파인엑셀은 30, 50 mg/kg을 투여하였으며, 복합군은 파인엑셀 50 mg/kg 군을 기준(고추씨 농도제시)으로 파인엑셀:고추씨 =2:1, 4:1로 약 13주간 투여함



C57BL/6J, 5 weeks, Male

Room condition : 22±2°C, 50±10% relative humidity

Diet : 7% Kcal fat diet (Normal diet) or 60% Kcal fat diet (High fat diet: HFD)

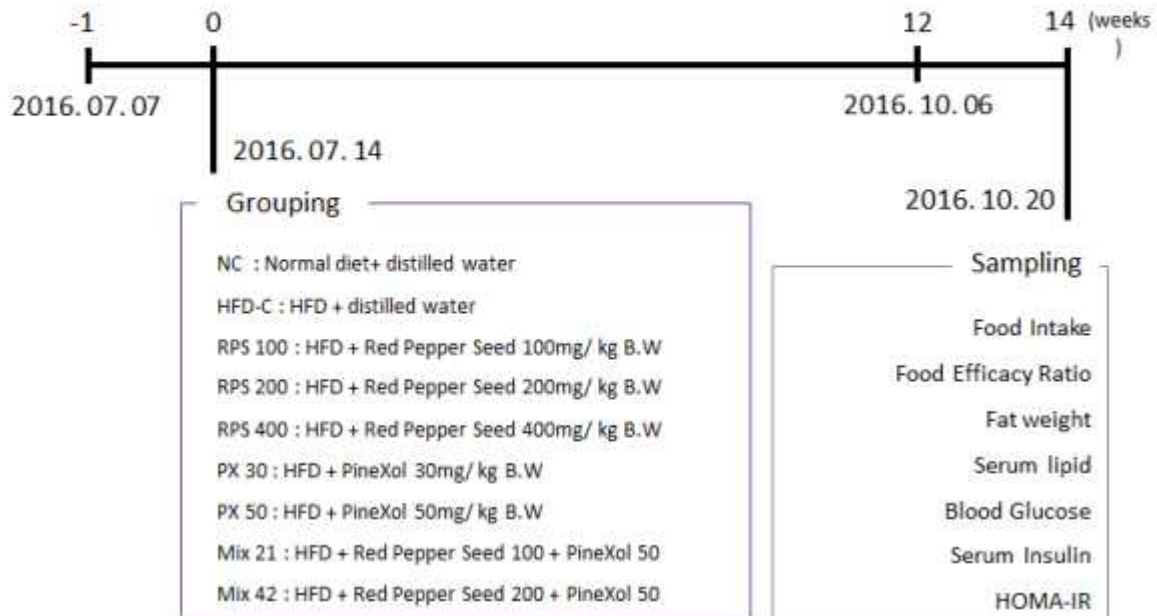


Fig 64. HFD 비만 동물실험 디자인

## 가. 개별 추출물의 체지방 감소/인슐린 저항성 억제 효과

### (1) 고추씨 추출물의 체지방 감소/인슐린 저항성 억제 효과

#### (가) 체중 측정

- 실험동물을 13주간 사육하면서 매주 체중을 측정한 결과, 고지방 식이 대조군이 기본식이 대조군에 비해 8주부터 유의적으로 증가함(Fig. 65A)
- 실험 11주부터 고지방식이 투여로 인해 증가된 체중을 고추씨 추출물이 유의적으로 감소하였으며, 특히 고추씨 추출물 200 mg/kg 투여군은 기본식이 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않음(Fig. 65A)
- 실험 기간 동안 체중 증가도 고추씨 추출물 200 mg/kg 투여군이 고지방식이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 기본 식이 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않음(Fig. 65B)
- 이는 고지방 식이로 인해 증가된 체중을 고추씨 추출물 투여로 인해 기본 식이를 섭취한 동물의 체중까지 감소할 수 있다는 것을 의미함

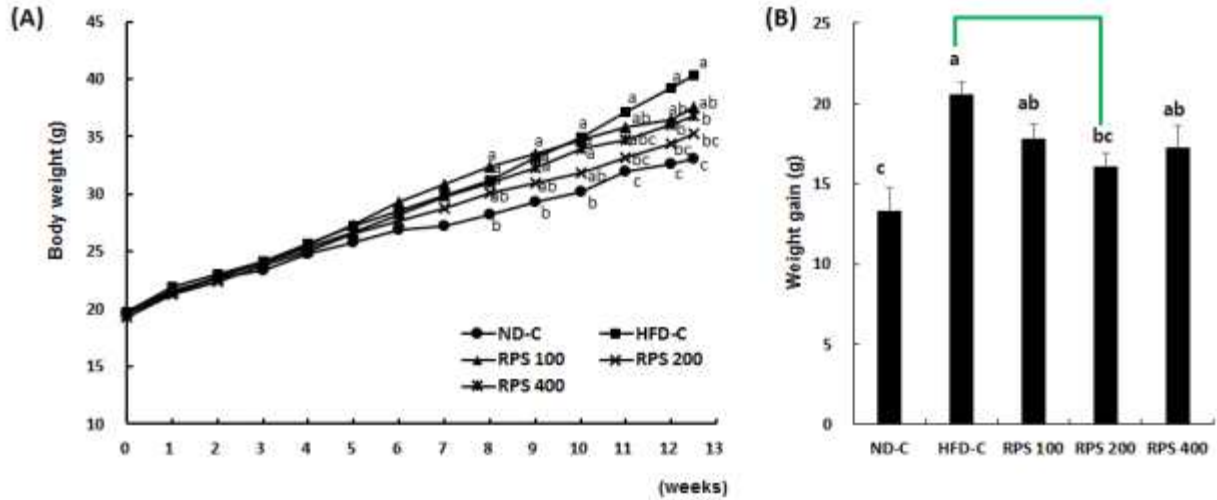


Fig 65. Effect of red pepper seed extract on body weight (A) and weight gain (B) in C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

(나) 식이 섭취량 측정

- 전 실험기간 동안의 식이섭취량을 측정 한 결과, 기본 식이 대조군이 고지방식이 대조군에 비해 유의적으로 높았으며, 고추씨 추출물 투여에 따른 차이가 없었음(Fig. 66)

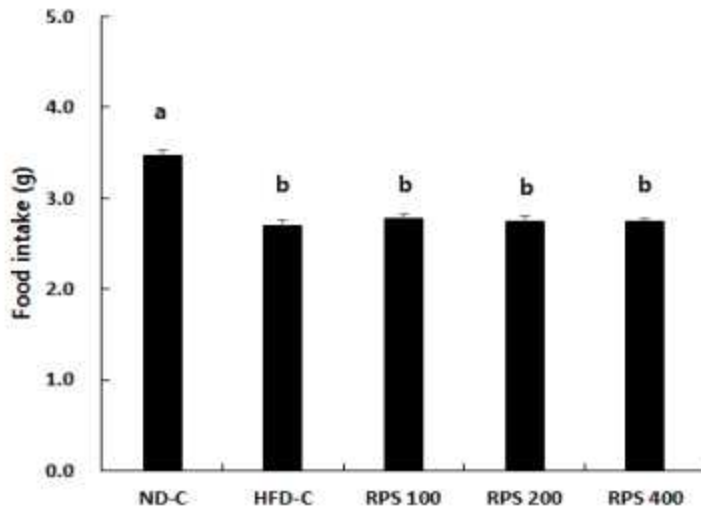


Fig 66. Effect of red pepper seed extract on food intake in C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

(다) 장기 무게 측정

- 실험동물에서 고추씨 추출물의 독성을 관찰하기 위해 실험 종료 후 간, 심장, 폐, 신장, 지라를 적출하고 육안으로 살펴 본 뒤 무게를 측정한 결과, 모든 군에서 장기 무게 변화가 관찰되지 않음(Table 26)

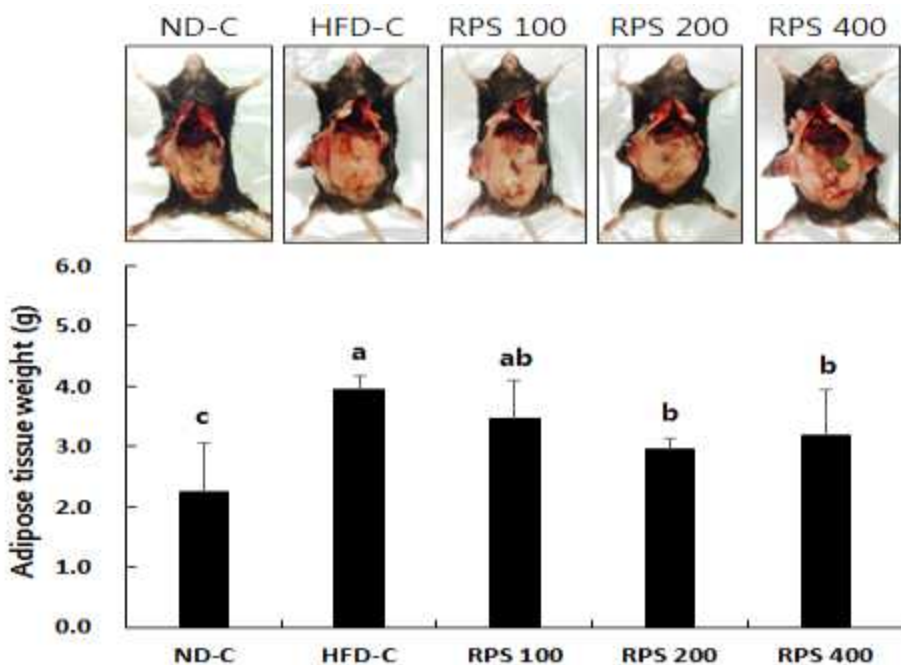
Table 26. Effect of red pepper seed extract on organ weights in C57BL/6 mice.

Groups	Tissue weight (g)				
	Liver	Heart	Lung	Kidney	Spleen
ND-C	0.92±0.03	0.12±0.00	0.13±0.00	0.28±0.01	0.06±0.00
HFD-C	1.00±0.03	0.12±0.01	0.13±0.01	0.29±0.01	0.06±0.01
RPS 100	0.96±0.02	0.13±0.00	0.13±0.00	0.31±0.01	0.06±0.00
RPS 200	0.92±0.05	0.13±0.00	0.13±0.00	0.31±0.01	0.06±0.00
RPS 400	0.89±0.04	0.12±0.00	0.12±0.00	0.30±0.01	0.07±0.00

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

(라) 총지방량 측정

- 실험 종료 후 복부를 절개하여 총 지방량의 무게를 측정한 결과, 고지방 식이 대조군은 기본식이 대조군에 비해 유의적으로 증가함(Fig. 67)
- 고추씨 200, 400 mg/kg 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 유의적으로 총지방량이 감소함. 특히 200 mg/kg 투여군이 가장 크게 감소함(Fig. 67)



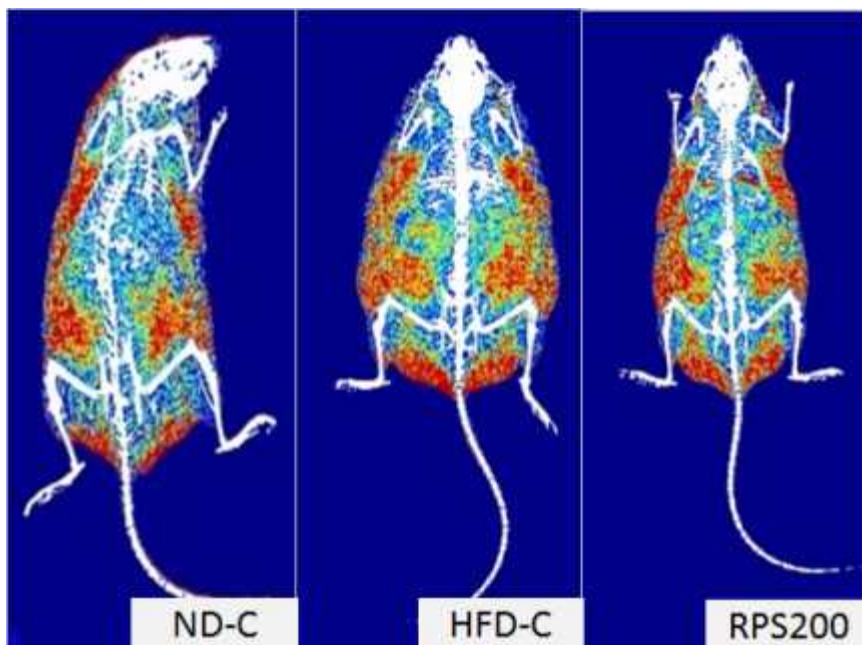


**Fig 67. Effect of red pepper seed extract on adipose tissue weight in C57BL/6 mice.**

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

(마) DEXA를 이용한 체성분 측정

- 실험 12주에 DEXA(Dual energy X-ray Absorptiometry)를 이용하여 체중, 체지방 함량, 근육량, 골밀도 등을 측정한 결과, 고추씨 200 mg/kg 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 지방함량이 감소하는 경향을 보임(Fig. 68)



**Fig 68. Effect of red pepper seed extracts on fat composition in C57BL/6 mice.**

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

(바) 고추씨 추출물의 지질 대사 이상 억제 효과

- 혈청 중성지방을 측정한 결과, 고지방식이 대조군이 기본식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 고지방식이 투여로 인해 증가된 중성지방을 고추씨 추출물 200 mg/kg 투여군이 유의적으로 감소시켰음(Fig. 69)
- 콜레스테롤은 고지방식이 대조군에 비해 고추씨 추출물 투여군이 감소하는 경향을 보임(Fig. 69)

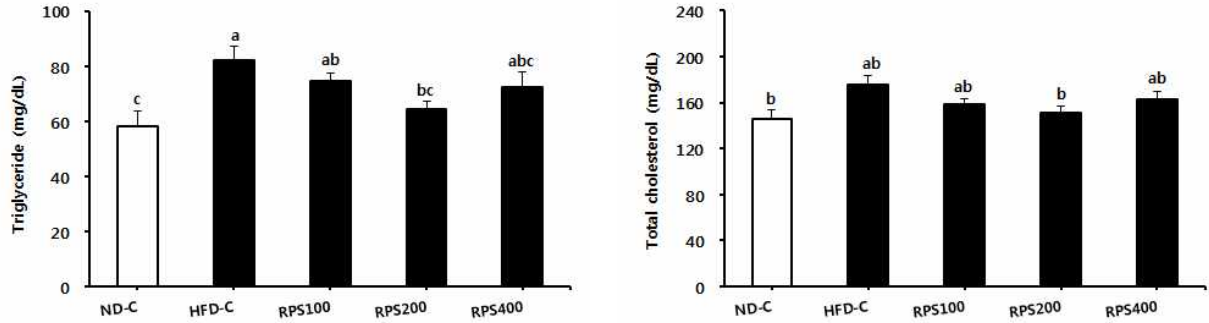


Fig 69. Effect of red pepper seed extract on serum triglyceride and total cholesterol in C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

- HDL-콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤은 모든 군에서 비슷한 경향을 보였으나 고추씨 추출물 200mg/kg을 투여한 실험군(RPS 200)은 고지방식이 대조군(HFD-C)에 비해 유의적으로 LDL-콜레스테롤이 감소하였음 ( $p < 0.05$ ) (Fig. 70)

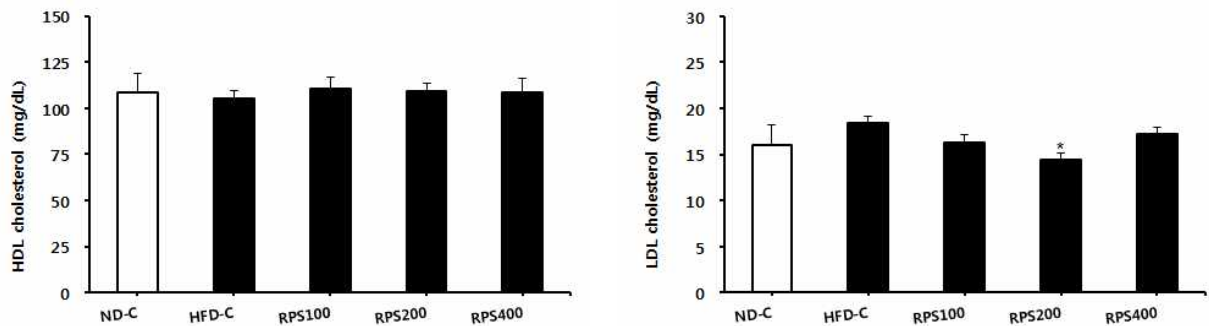


Fig 70. Effect of red pepper seed extract on serum HDL-cholesterol and LDL-cholesterol in C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

(사) 고추씨 추출물의 인슐린저항성 억제 효과

- 혈당과 인슐린을 측정한 결과, 고지방 식이 대조군이 기본 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 고지방식이 투여로 인해 증가된 혈당과 인슐린을 고추씨 추출물이 유의적으로 감소하였음 (Fig. 71A)
- HOMA-IR도 고지방 식이 대조군에 비해 고추씨 추출물 투여군이 유의적으로 감소함 (Fig. 71B)



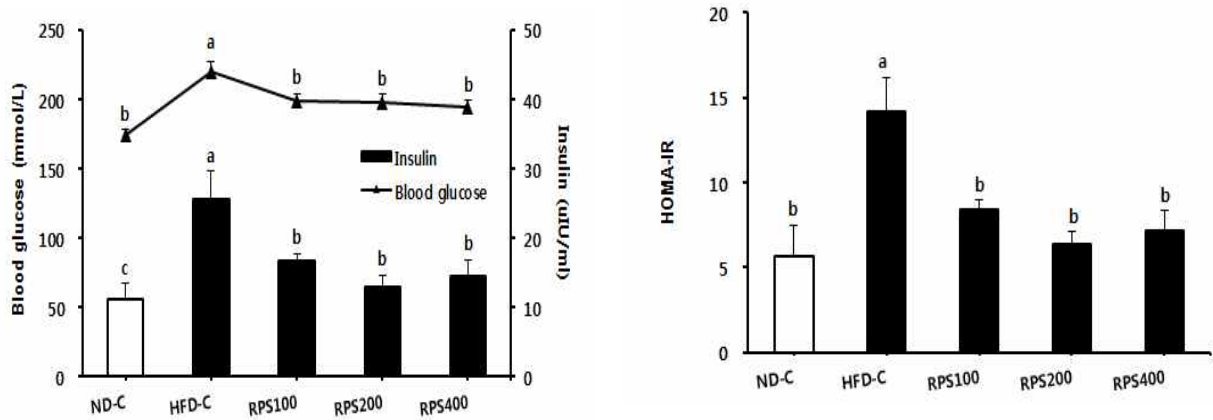


Fig 71. Effect of red pepper seed extract on fasting blood glucose, insulin, and HOMA-IR in C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

(아) 고추씨 추출물의 체지방 및 지질대사에 관여하는 유전자 발현에 대한 영향

- 동물실험에서 체중 저하 및 인슐린저항성 개선 효과가 있는 고추씨 추출물 투여군을 선정하여 단백질 발현 실험을 진행하였음
- 지방세포의 분화 과정에서 C/EBP family, PPAR- $\gamma$  및 SREBP-1c 등의 전사인자들은 상호 작용을 통해 지방의 축적, 합성, 수송에 관여하는 인자들을 작용시켜 비만에 이르게 하고, 이러한 전사인자들의 하위 인자로는 지방합성, 이동, 저장에 관여하는 acyl-CoA synthetase-1 (ACSL1), fatty acid synthesis (FAS), fatty acid transport-1 (FATP1) 등이 있다고 보고되었음
- 따라서, 본 과제에서는 지방조직에서 C/EBP family, PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c, FAS, FABP4 를 측정하였음
- PPAR- $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$ , SREBP-1c의 단백질 발현 측정결과, 고지방 식이 대조군이 기본 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 고추씨 추출물이 고지방 식이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음(Fig. 72)
- 특히 고추씨 추출물 200 mg/kg 투여군은 기본식이 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않음

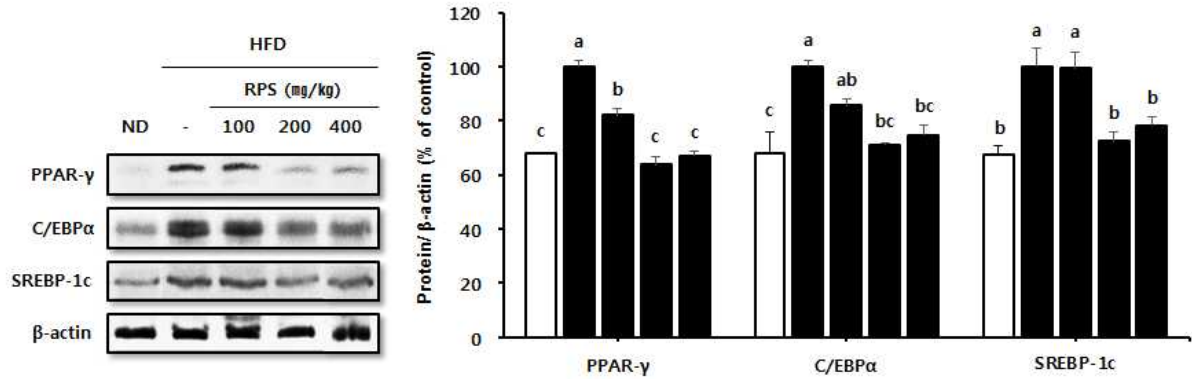


Fig 72. Effect of red pepper seed extract on differentiation transcription factor (PPAR- $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$ , and SREBP-1c) expression in adipose tissue of C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

- FAS, FABP4의 단백질 발현 측정결과, 고지방 식이 대조군이 기본 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 고추씨 추출물이 고지방 식이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음(Fig. 73)
- 특히 고추씨 추출물 200 mg/kg 투여군은 기본식이 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않음

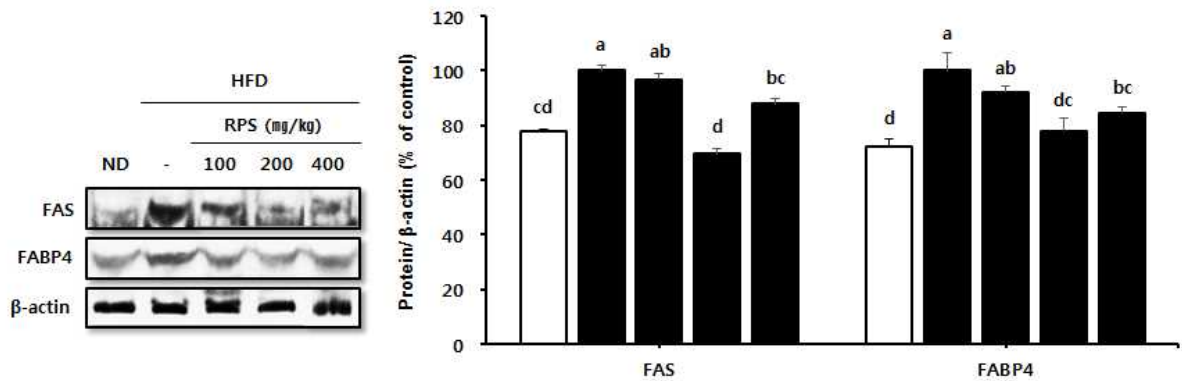


Fig 73. Effect of red pepper seed extract on differentiation transcription factor (FAS and FABP4) expression in adipose tissue of C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

(자) 고추씨 추출물의 에너지 대사 조절에 관여하는 유전자 발현에 대한 영향

- AMPK 단백질은 에너지 대사 경로의 핵심인자로 작용하며, 세포 내에 AMP를 감지하여 활성화되는 단백질이며, 지방생성을 저해하는 것으로 알려져 있음
- AMPK 활성형태인 phospho AMPK의 표적 단백질로 알려진 첫 번째 단백질은 지질 축

적을 촉진하는 ACC이며, ACC는 AMPK에 의해 인산화 되어 불활성 형인 phospho ACC 가 증가한다고 보고됨

- p-AMPK의 단백질 발현 측정결과, 고추씨 추출물 200 mg/kg 투여군이 고지방 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였음 (Fig. 74)

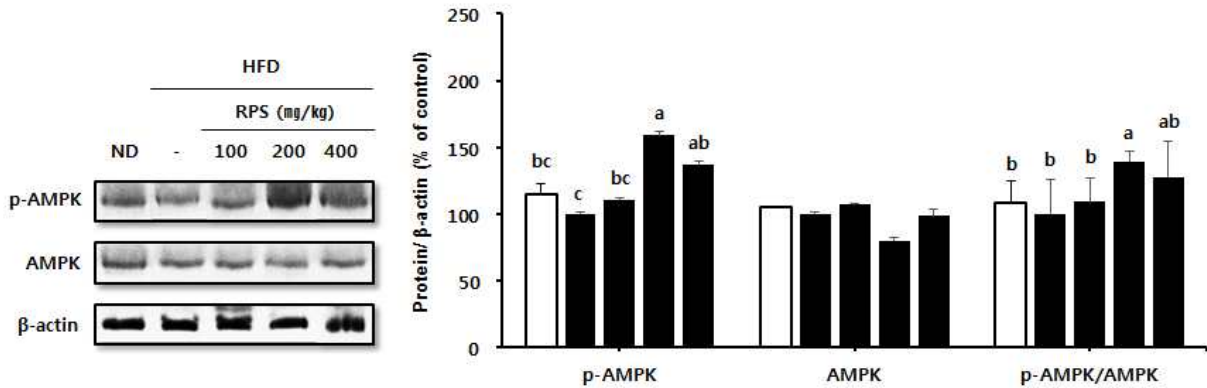


Fig 74. Effect of red pepper seed extract on AMPK expression in adipose tissue of C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

- p-ACC의 단백질 발현 측정결과, 고추씨 추출물 200 mg/kg 투여군이 고지방 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 기본 식이 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않음 (Fig. 75)

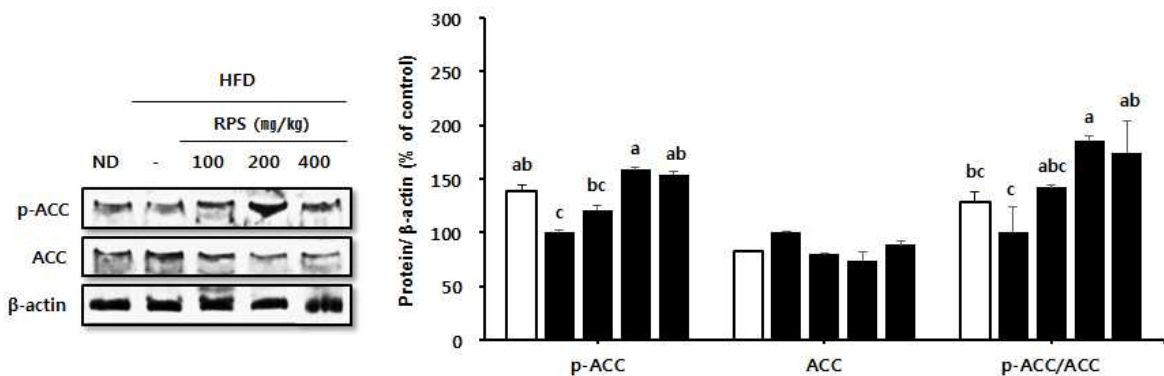


Fig 75. Effect of red pepper seed extract on ACC expression in adipose tissue of C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

- (차) 고추씨 추출물의 간조직 내 지방생성 및 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현에 대한 영향
  - 간은 중성지방과 콜레스테롤의 합성, 혈당의 항상성 유지 등의 역할을 하는 주요대사

기관 중 하나임

- 간의 SREBP-1c, FAS 및 ACC 단백질 발현의 억제는 비만으로 인한 비알코올성 지방간, 제 2형 당뇨병, 심혈관 질환, 대사성 질환 등의 예방에 중요한 역할을 함
- 또한, 활성화된 AMPK 단백질은 SREBP-1c에 결합하고, 이는 ACC, FAS와 같은 지질 합성 관련 단백질 발현을 억제하는 것으로 알려져 있음
- 간 조직에서 SREBP-1c과 SREBP-2의 단백질 발현 측정결과, 고지방 식이 대조군이 기본 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 고추씨 추출물이 고지방 식이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음 (Fig. 76)

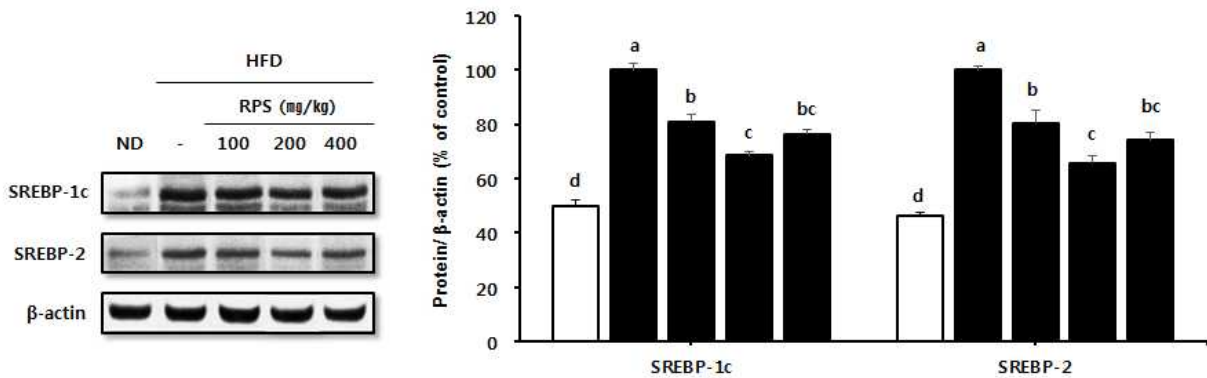


Fig 76. Effect of red pepper seed extract on SREBP-1c and SREBP-2 expression in liver tissue of C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

- 간 조직에서 FAS와 FABP1의 단백질 발현 측정결과, 고지방 식이 대조군이 기본 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 고추씨 투여군이 고지방 식이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음. 간 조직의 p-ACC/ACC은 고지방식이군에 비해 고추씨 투여군이 유의적으로 증가하였음 (Fig. 77)

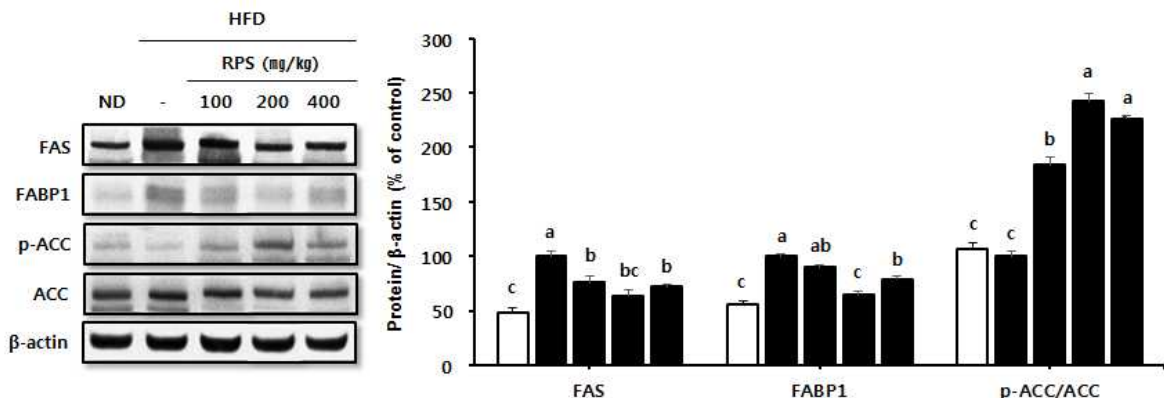


Fig 77. Effect of red pepper seed extract on FAS, FABP1, and p-ACC expression in liver tissue of C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

- 간 조직에서 p-AMPK 단백질 발현 측정결과, 고지방 식이 대조군이 기본 식이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 고추씨 투여군이 고지방 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였음(Fig. 78)
- 특히 고추씨 추출물 200 mg/kg 투여군은 기본식이 대조군보다 유의적으로 증가함

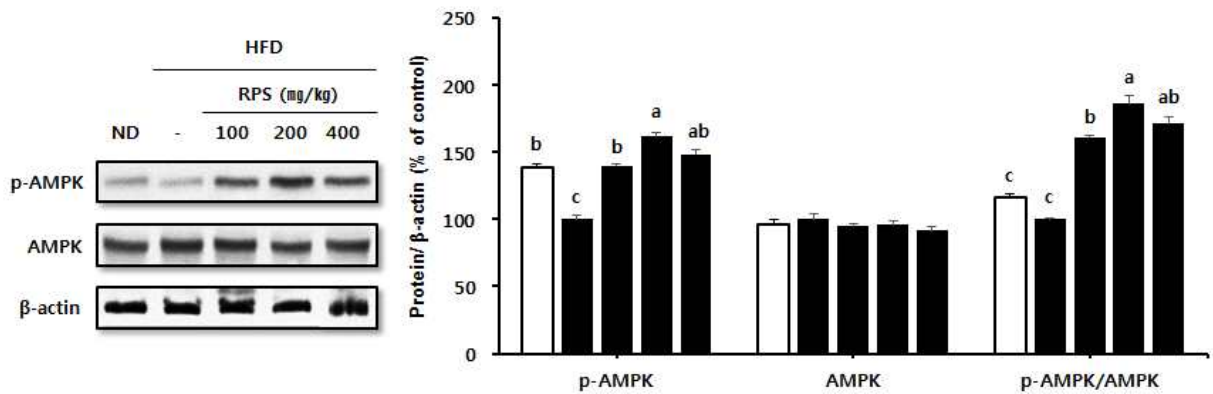


Fig 78. Effect of red pepper seed extract on p-AMPK expression in liver tissue of C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

## (2) 파인엑솔의 체지방 감소 효과

### (가) 체중 측정

- 실험결과, 체중과 체중 증가량은 고지방 식이 대조군이 기본 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 파인엑솔 투여군은 감소하는 경향을 보임(Fig. 79)

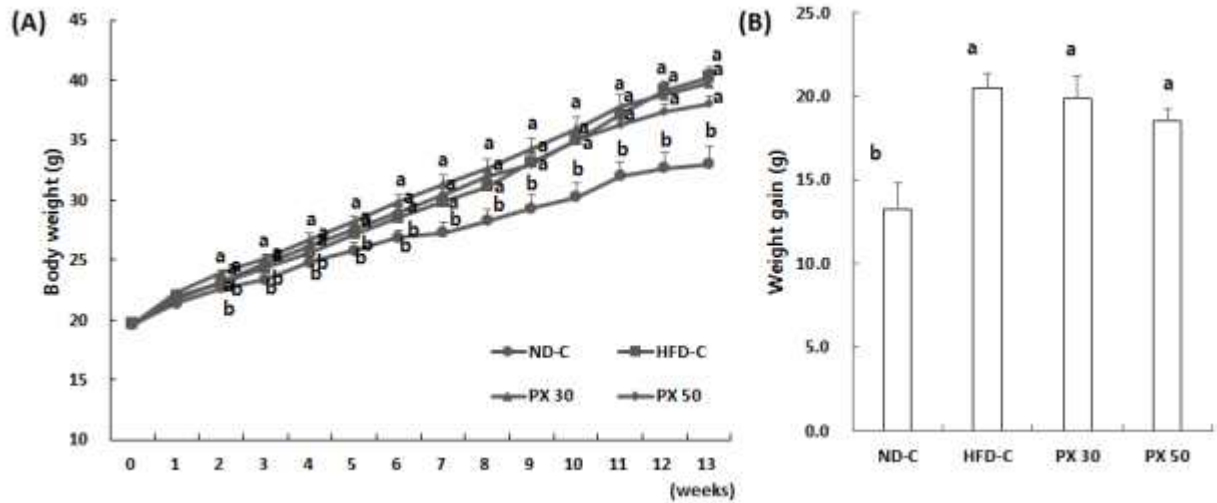


Fig 79. Effect of PineXol on body weight (A) and weight gain (B) in C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, PX 30 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 30 mg/kg body weight, PX 50 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 50 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

(나) 식이 섭취량 측정

- 전 실험기간 동안의 식이섭취량을 측정 한 결과, 기본 식이 대조군이 고지방 식이 대조군에 비해 유의적으로 높았으며, 고지방 섭취군에서 파인엑솔의 효과는 관찰할 수 없었음(Fig. 80)

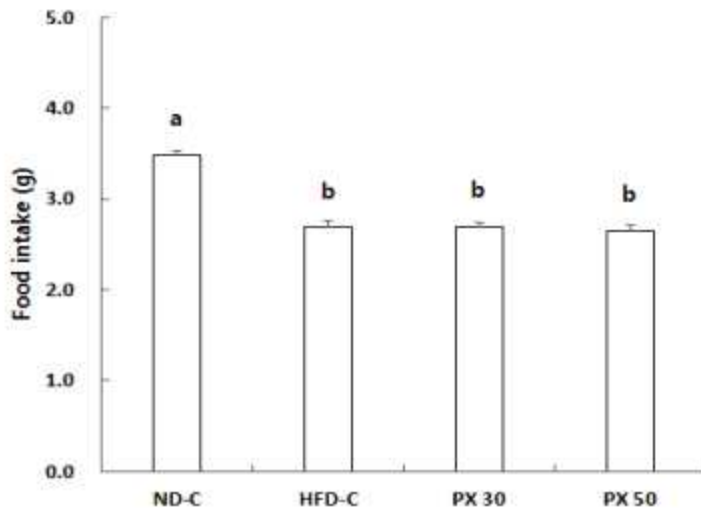


Fig 80. Effect of PineXol on food intake in C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, PX 30 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 30 mg/kg body weight, PX 50 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 50 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

(다) 장기 무게

- 실험동물에서 파인엑솔 추출물의 독성을 관찰하기 위해 실험 종료 후 간, 심장, 폐, 신장, 지라를 적출하고 육안으로 살펴 본 뒤 무게를 측정된 결과, 모든 군에서 장기 무게 변화가 관찰되지 않음
- 또한, 총지방량의 무게를 측정된 결과, 고지방 식이 대조군이 기본 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 고지방 섭취군에서 파인엑솔의 효과는 관찰할 수 없었음 (Table. 27)

Table 27. Effect of PineXol on organ weights in C57BL/6 mice.

Groups	Tissue weight (g)					
	Adipose tissue	Liver	Heart	Lung	Kidney	Spleen
ND-C	2.26±0.36 <sup>b</sup>	0.92±0.03	0.12±0.00	0.13±0.00	0.28±0.01	0.06±0.00
HFD-C	3.97±0.11 <sup>a</sup>	1.00±0.03	0.12±0.01	0.13±0.01	0.29±0.01	0.067±0.01
PX 30	3.65±0.27 <sup>a</sup>	0.91±0.05	0.12±0.00	0.12±0.01	0.31±0.01	0.06±0.00
PX 50	3.43±0.28 <sup>a</sup>	0.94±0.03	0.12±0.00	0.12±0.00	0.30±0.01	0.06±0.00

ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, PX 30 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 30 mg/kg body weight, PX 50 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 50 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

(라) 파인엑솔군의 지질대사 및 인슐린저항성 억제 효과

- 중성지방을 측정된 결과, 고지방 식이 대조군이 기본 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 고지방 식이 대조군에 비해 파인엑솔 투여군이 감소하는 경향을 보임 (Fig. 81)
- 콜레스테롤은 고지방 식이 대조군에 비해 파인엑솔 투여군이 감소하는 경향을 보임 (Fig. 81)

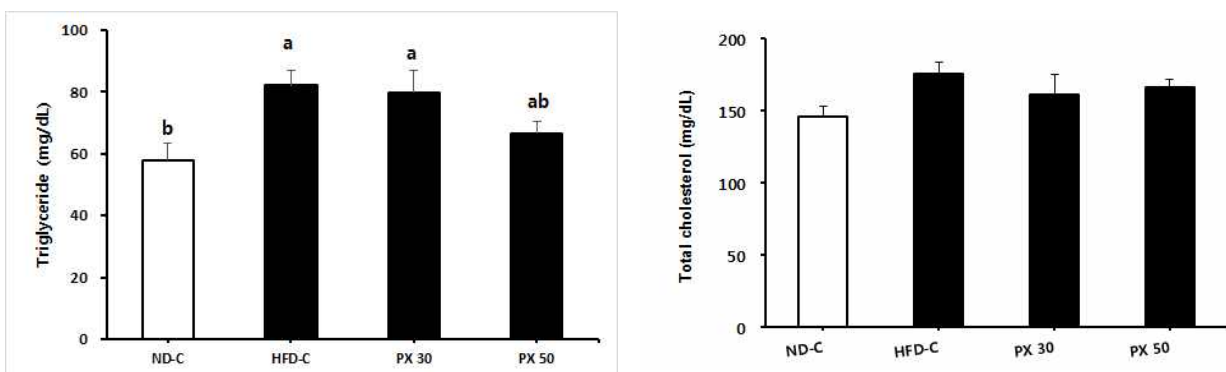


Fig 81. Effect of PineXol on serum triglyceride and total cholesterol in C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, PX 30 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 30 mg/kg body weight, PX 50 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 50 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).



- 혈당, 인슐린과 HOMA-IR을 측정한 결과, 고지방 식이 대조군에 비해 파인엑셀 투여군이 감소하는 경향을 보임(Fig. 82)

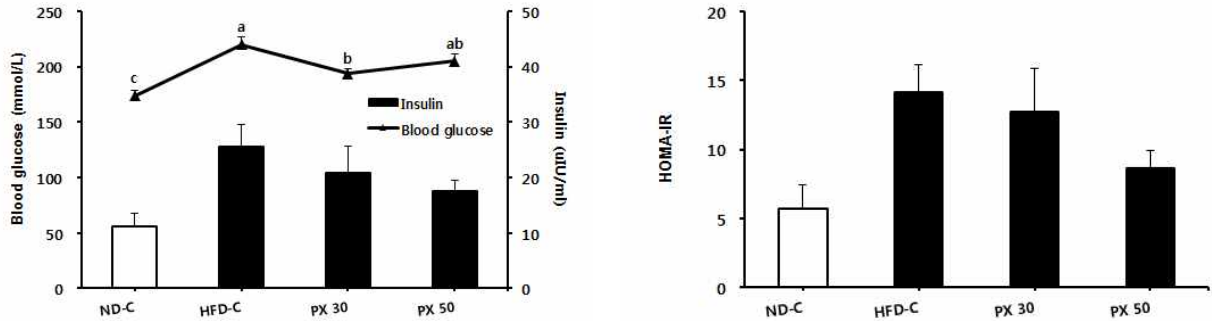


Fig 82. Effect of PineXol on blood glucose, insulin, and HOMA-IR in C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, PX 30 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 30 mg/kg body weight, PX 50 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 50 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

## 나. 복합 추출물의 체지방 감소 효과

### (1) 체중 변화

- 실험결과, 체중과 체중 증가량은 고지방 식이 대조군이 기본 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 파인엑셀 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 감소하는 경향을 보임(Fig. 83)

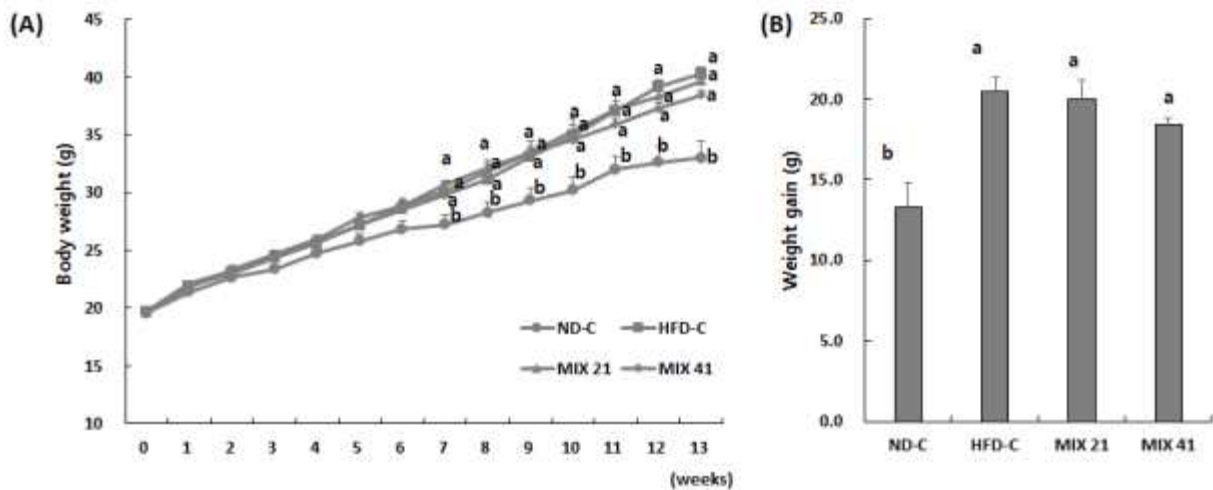


Fig 83. Effect of mixture on body weight (A) and weight gain (B) in C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, MIX 21 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 100 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight), MIX 41 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 200 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight). Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

### (2) 식이 섭취량 측정

- 전 실험기간 동안의 식이섭취량을 측정 한 결과, 기본 식이 대조군이 고지방 식이 대조군에 비해 유의적으로 높았음(Fig. 84)



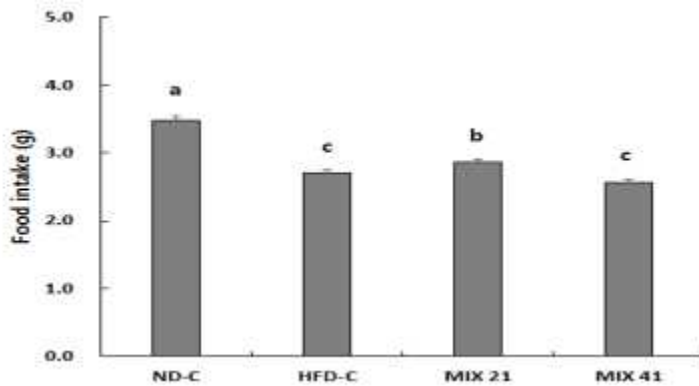


Fig 84. Effect of mixture on food intake in C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, MIX 21 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 100 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight), MIX 41 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 200 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight). Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

### (3) 장기 무게

- 실험동물에서 복합 추출물의 독성을 관찰하기 위해 실험 종료 후 간, 심장, 폐, 신장, 지라를 적출하고 육안으로 살펴 본 뒤 무게를 측정한 결과, 모든 군에서 장기 무게 변화가 관찰되지 않음
- 또한, 총지방량의 무게를 측정한 결과, 고지방 식이 대조군이 기본 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 고지방식이 섭취군은 차이가 없었음(Table 28)

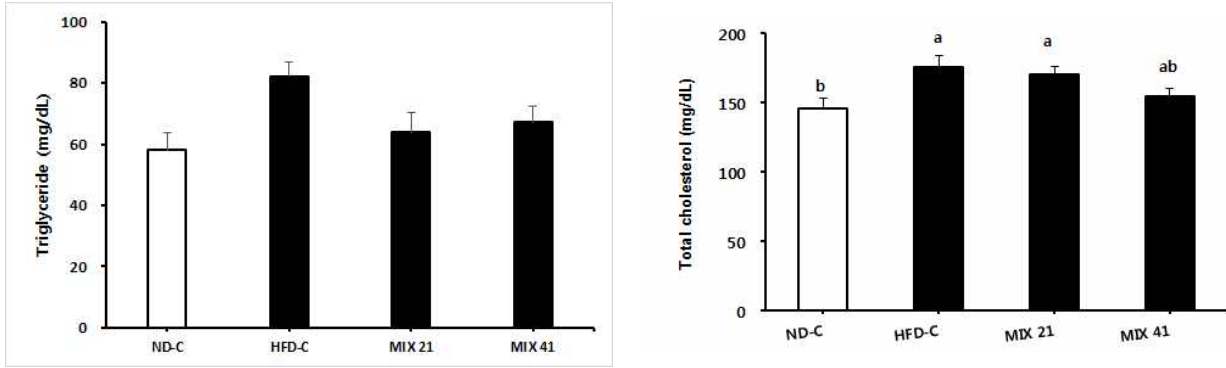
Table 28. Effect of mixture on organ weights in C57BL/6 mice.

Groups	Tissue weight (g)					
	Adipose tissue	Liver	Heart	Lung	Kidney	Spleen
ND-C	2.26±0.36 <sup>b</sup>	0.92±0.03	0.12±0.00	0.13±0.00	0.28±0.01	0.06±0.00
HFD-C	3.94±0.09 <sup>a</sup>	1.00±0.03	0.12±0.01	0.13±0.01	0.29±0.01	0.067±0.01
MIX 21	3.50±0.16 <sup>a</sup>	0.99±0.08	0.12±0.00	0.13±0.00	0.30±0.01	0.06±0.00
MIX 41	3.66±0.08 <sup>a</sup>	0.88±0.04	0.11±0.00	0.12±0.00	0.29±0.01	0.06±0.01

ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, MIX 21 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 100 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight), MIX 41 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 200 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight). Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

### (4) 지질대사 및 인슐린저항성 억제 효과

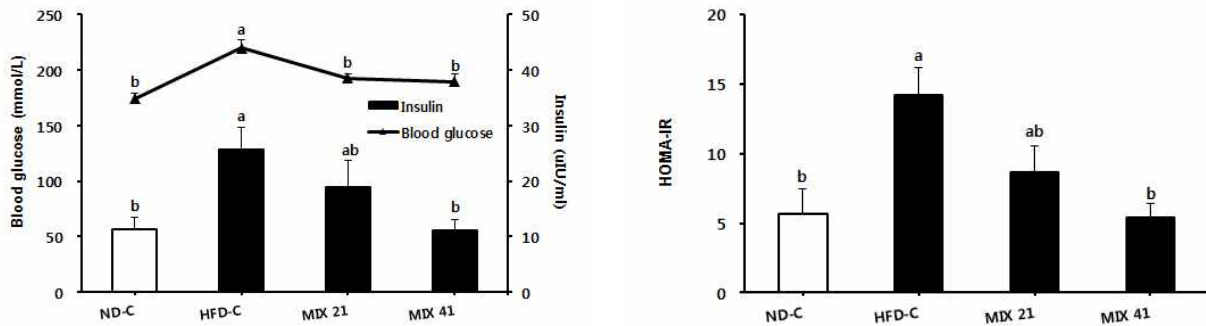
- 중성지방을 측정한 결과, 고지방 식이 대조군에 비해 복합군이 감소하는 경향을 보임 (Fig. 85A)
- 콜레스테롤은 고지방 식이 대조군이 기본 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 고지방 식이 대조군에 비해 복합군이 감소하는 경향을 보임(Fig. 85B)



**Fig 85. Effect of mixture on serum triglyceride and total cholesterol in C57BL/6 mice.**

ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, MIX 21 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 100 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight), MIX 41 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 200 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight). Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

- 혈당, 인슐린과 HOMA-IR을 측정된 결과, 고지방 식이 대조군이 기본 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 복합군 41은 고지방식이 대조군에 비해 유의적으로 감소하였음(Fig. 86)



**Fig 86. Effect of mixture on fasting blood glucose, insulin, and HOMA-IR in C57BL/6 mice.**

ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, MIX 21 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 100 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight), MIX 41 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 200 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight). Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

#### 다. 파인엑솔, 복합 추출물 지방분화 및 생성에 관여하는 유전자 발현 검증

- 본 과제에서는 지방조직에서 C/EBP family, PPAR- $\gamma$ , SREBP-1c, FAS, FABP4를 측정하였음
- PPAR- $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$ , SREBP-1c의 단백질 발현 측정결과, 파인엑솔과 복합군은 고지방식이 대조군과 비슷한 경향을 나타냄 (Fig. 87)

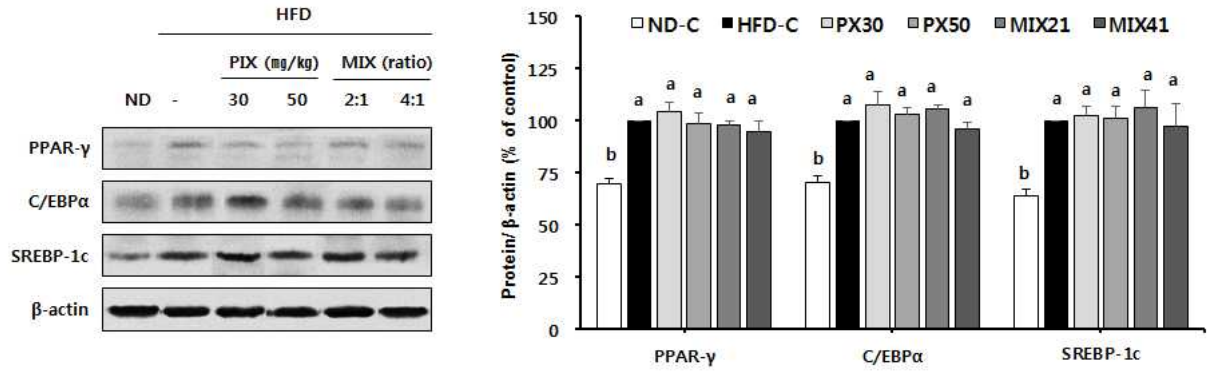


Fig 87. Effect of PineXol and mixture on differentiation transcription factor (PPAR- $\gamma$ , C/EBP  $\alpha$ , and SREBP-1c) expression in adipose tissue of C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, PX 30 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 30 mg/kg body weight, PX 50 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 50 mg/kg body weight. MIX 21 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 100 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight), MIX 41 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 200 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight). Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

- FAS 단백질 발현 측정결과, 파인엑솔과 복합군은 고지방식이 대조군과 비슷한 경향을 나타냄 (Fig. 88)

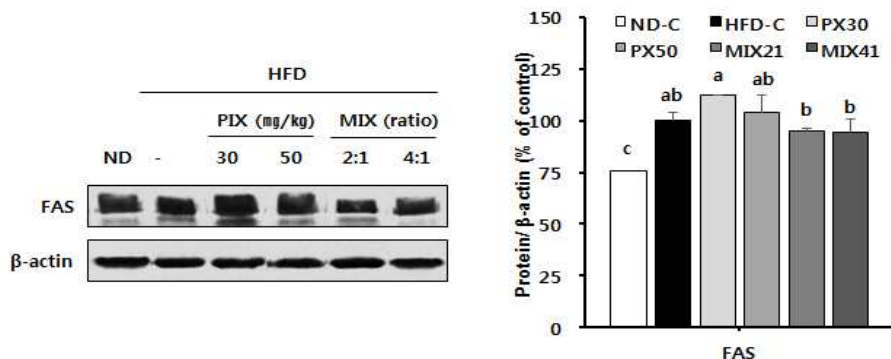


Fig 88. Effect of PineXol and mixture on differentiation transcription factor (FAS) expression in adipose tissue of C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, PX 30 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 30 mg/kg body weight, PX 50 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 50 mg/kg body weight. MIX 21 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 100 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight), MIX 41 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 200 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight). Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

#### 라. 파인엑솔과 복합군의 에너지 대사 조절에 관여하는 유전자 발현 검증

- p-AMPK의 단백질 발현 측정결과, 복합군이 고지방 식이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고, 파인엑솔군은 고지방 식이 대조군과 비슷한 경향을 나타냄 (Fig. 89)

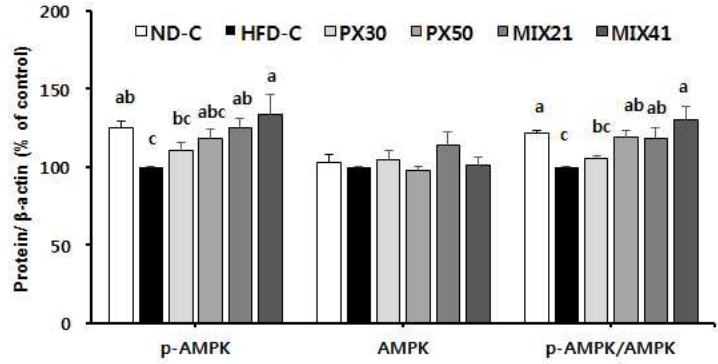
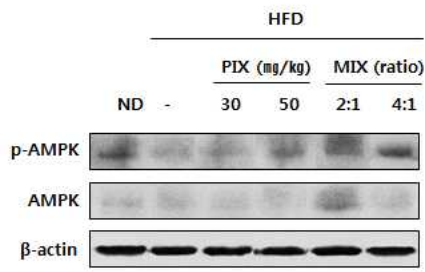


Fig 89. Effect of PineXol and mixture on AMPK expression in adipose tissue of C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, ND-C : Normal diet (7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet (60% Kcal fat) + distilled water, PX 30 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 30 mg/kg body weight, PX 50 : High fat diet (60% Kcal fat) + PineXol 50 mg/kg body weight. MIX 21 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 100 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight), MIX 41 : High fat diet (60% Kcal fat) + mixture (red pepper seed extract 200 mg/kg + PineXol 50 mg/kg body weight). Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

- p-ACC의 단백질 발현 측정결과, 파인엑솔과 복합군은 고지방식이 대조군과 비슷한 경향을 나타냄 (Fig. 90)

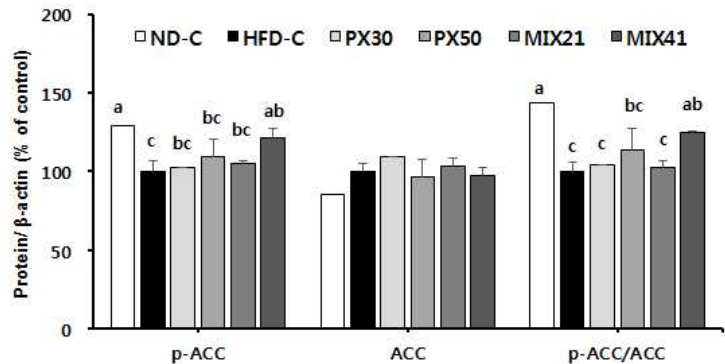
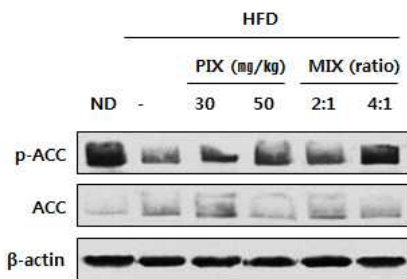


Fig 90. Effect of PineXol and mixture on ACC expression in adipose tissue of C57BL/6 mice.

ND-C : Normal diet(7% Kcal fat) + distilled water, HFD-C : High fat diet(60% Kcal fat) + distilled water, RPS 100 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 100 mg/kg body weight, RPS 200 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 200 mg/kg body weight, RPS 400 : High fat diet(60% Kcal fat) + red pepper seed extract 400 mg/kg body weight. Means with the same letter are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

### 3. 세포주를 이용한 개별/복합 기능성 소재의 인슐린 저항성 개선 및 지질 생합성 억제 효과 검증

#### 가. 근육세포와 간세포를 이용한 인슐린 저항성 개선 효과 검증

##### (1) 근육세포(C2C12)의 인슐린 저항성 개선 효과

- 파인엑솔/고추씨추출물 복합물에 의한 세포독성 실험을 진행함. 파인엑솔은 200  $\mu\text{g/mL}$

에서 세포독성이 나타남. 고추씨추출물은 200  $\mu\text{g/mL}$ 까지 세포 독성이 나타나지 않음. 복합소재의 경우 파인엑솔:고추씨추출물의 모든 처리 비율(50:50, 50:100, 100:50, 25:100, 100:25  $\mu\text{g/mL}$ )에서 세포독성이 나타나지 않음(Fig. 91)

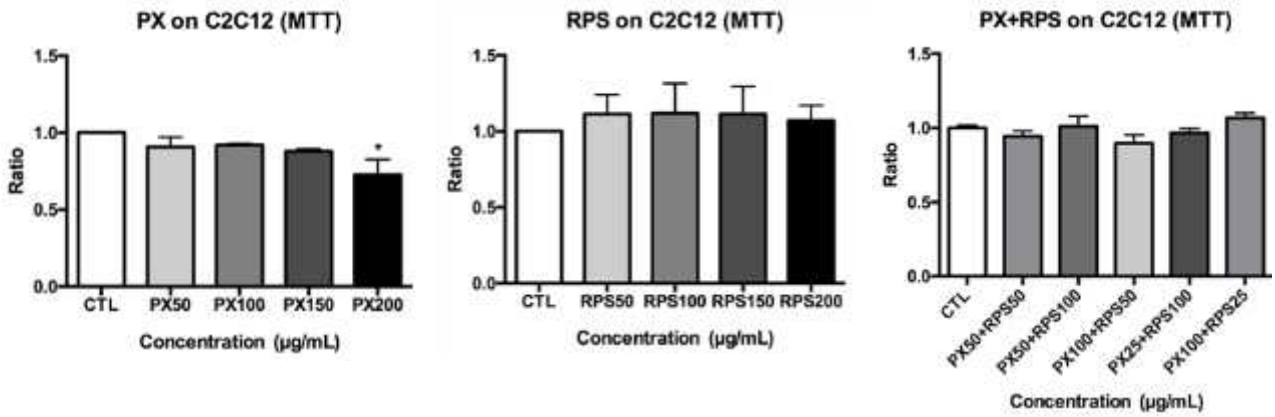


Fig 91. Effect of red pepper seed extracts and PineXol on viability in C2C12

- 혈액의 포도당을 근육으로 흡수하는 기전(glucose uptake)에 관여하는 단백질(GLUT4)을 측정. 고추씨 추출물(RPS)에서 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였으며, 200  $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의적 차이를 보임(Fig. 92)

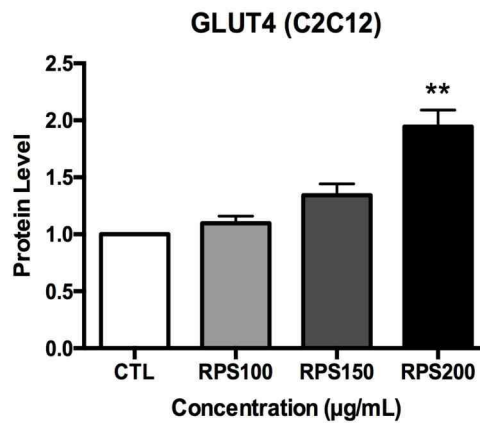


Fig 92. Effect of red pepper seed extracts and PineXol on GLUT4 protein expression in C2C12

## (2) 간세포(AML12)의 당신생합성 억제 효과

- 파인엑솔/고추씨추출물 복합물에 의한 세포독성 실험을 진행함. 파인엑솔은 200  $\mu\text{g/mL}$ 에서 세포독성이 나타남. 고추씨추출물은 200  $\mu\text{g/mL}$ 까지 세포 독성이 나타나지 않음. 복합소재의 경우 파인엑솔:고추씨추출물의 모든 처리 비율(50:50, 50:100, 100:50, 25:100, 100:25  $\mu\text{g/mL}$ )에서 세포독성이 나타나지 않음(Fig. 93)

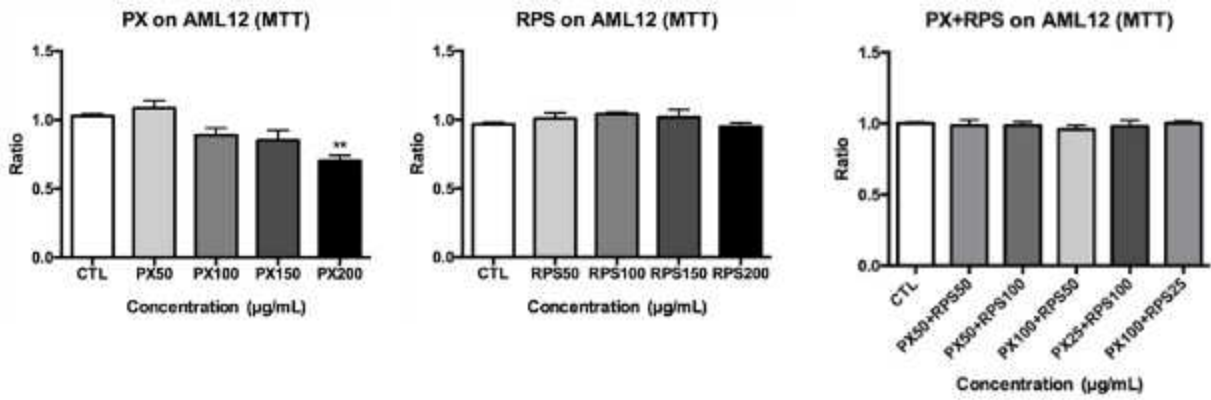


Fig 93. Effect of red pepper seed extracts and PineXol on viability in AML12

- AML12 간세포주를 활용하여 포도당 신생합성능을 평가함. 파인엑솔은 간세포의 포도당 신생합성에 영향을 주지 않음. 고추씨추출물은 100, 150, 200 μg/mL에서 간세포주의 포도당신생합성을 억제함. 복합소재(1:2 및 1:4) 처리 시 포도당 신생합성능이 감소하는 경향을 보이나 통계적 유의성을 보이지 않음(Fig. 94)

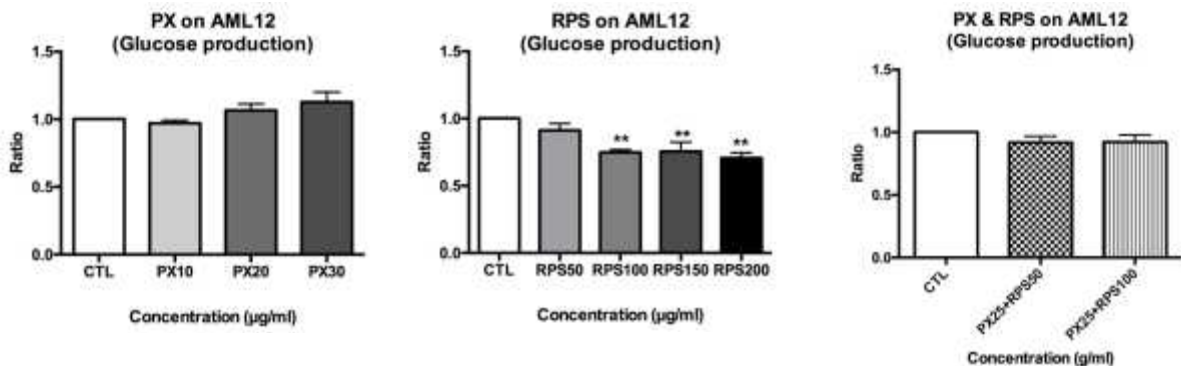


Fig 94. Effect of red pepper seed extracts and PineXol on glucose production in AML12

- G6Pase와 PEPCK는 간에서 당신생합성을 조절하는 주요 인자이며, 이들의 활성이 증가할 경우 간에서 당신생합성을 촉진함
- 실험 결과, 대조군에 비하여 파인엑솔과 고추씨 추출물은 유의적으로 G6Pase와 PEPCK 단백질 발현량을 감소시켰으며, 혼합물에서도 유의적으로 감소함(Fig. 95, 96)
- 이는 파인엑솔과 고추씨 추출물이 당대사 조절 기전을 거칠 수 있음을 시사함

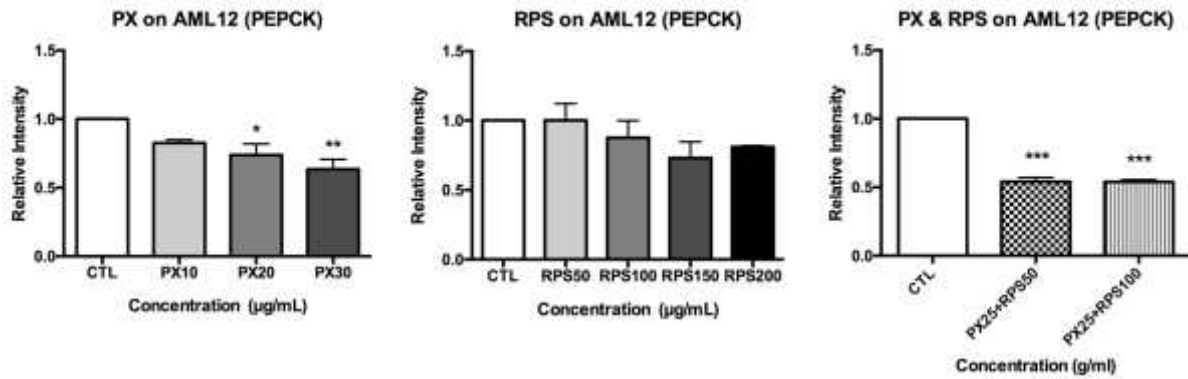


Fig 95. Effect of red pepper seed extracts and PineXol on PEPCK expression in AML12

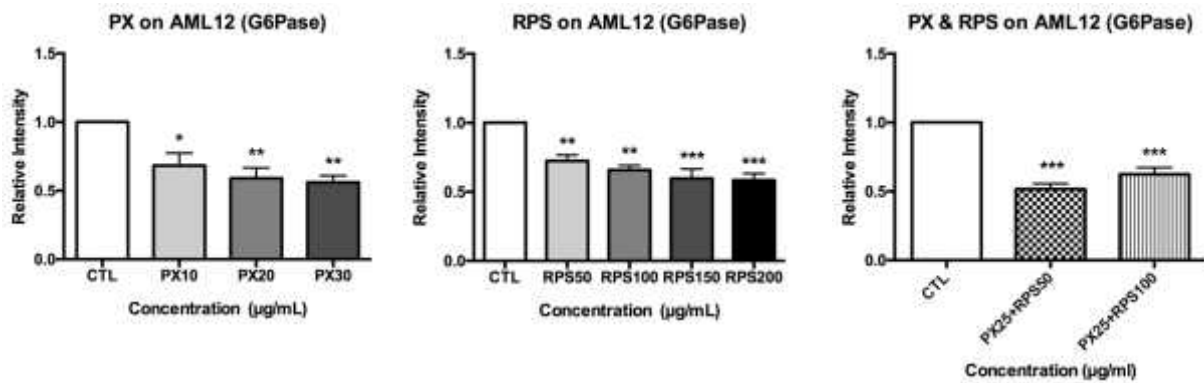


Fig 96. Effect of red pepper seed extracts and PineXol on G6Pase expression in AML12

## 나. 간세포(HepG2)를 통해 지질생합성 억제 효과 검증

### (1) 간세포주에서 파인엑솔의 지질생합성 억제 효과

- 파인엑솔은 200 μg/mL에서 세포독성을 나타냄(Fig. 97)

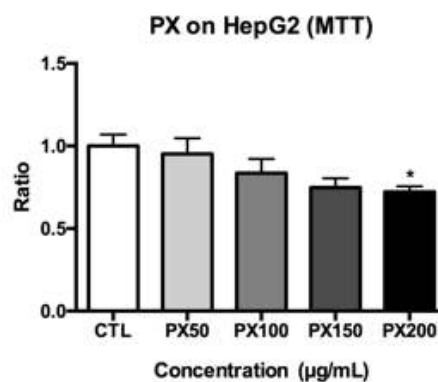


Fig 97. Effect of PineXol on viability in HepG2

- 간세포 내 중성지질(TG) 및 총 콜레스테롤(TC)을 측정하기 위해 파인엑솔 50, 100, 150 μg/mL을 48시간 처리한 후, NP-40로 지방을 추출하여 정량한 후 단백질 농도로 나누어 계산함
- 파인엑솔 150 μg/mL에서 유의적으로 중성지질이 감소하였으며, 100, 150 μg/mL에서 유의적으로 총 콜레스테롤이 감소함(Fig. 98)



- 고추씨 추출물과 혼합물은 중성지질과 총 콜레스테롤에 영향을 주지 않음

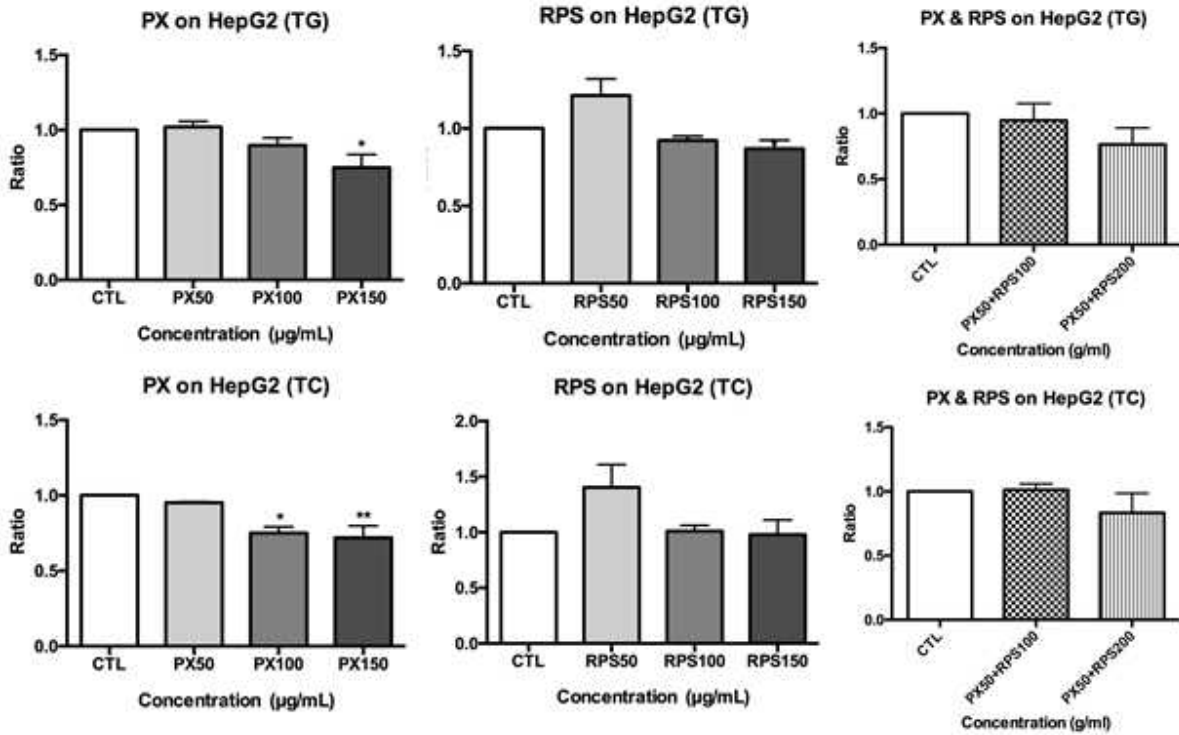


Fig 98. Effect of red pepper seed extracts and PineXol on lipogenesis in HepG2

- ACC와 FAS 및 SCD1은 지질생합성의 주요 인자들이며, GPAM과 DGAT은 중성지질 합성에 관여하는 인자들임. SREBP1은 지질생합성을 조절하는 전사 인자임  
 - 대조군 대비 파인엑솔 처리군에서 P-ACC/ACC와 FAS 단백질 발현에 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, SCD1, GPAM, DGAT, SREBP1은 발현이 감소함(Fig. 99)

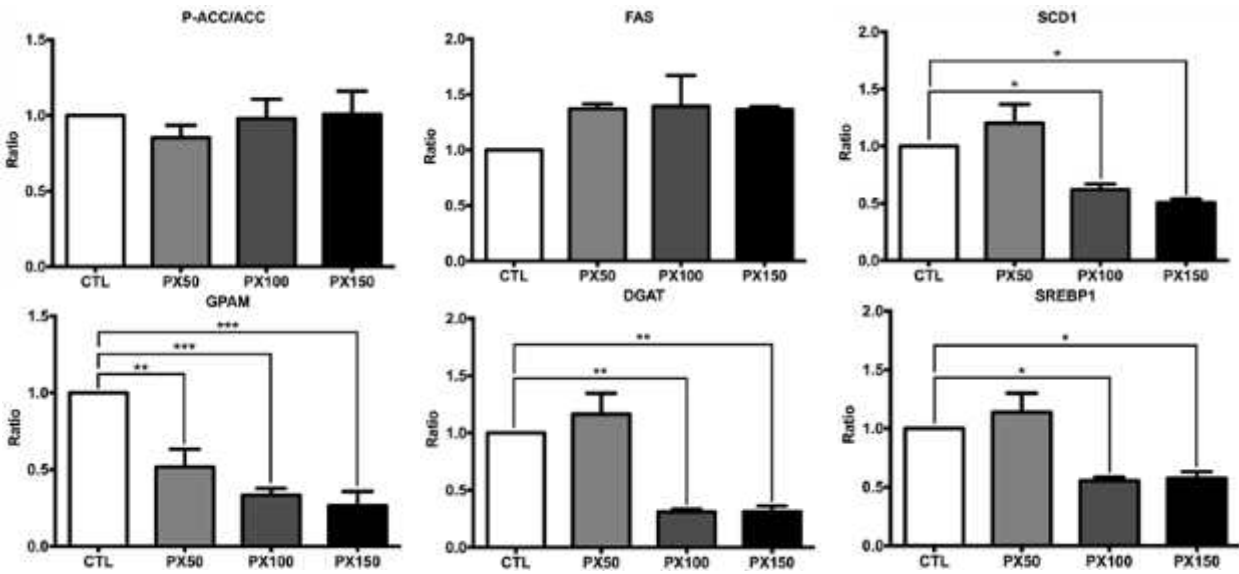


Fig 99. Effect of PineXol on lipogenesis related protein expression in HepG2



#### 4. 제 2형 당뇨병이 유발된 마우스 모델을 통한 개별 및 복합물의 체지방 감소 및 혈당 개선 효과 검증

##### 가. 동물실험 설계

- 선행 연구로 효과가 입증된 고추씨 추출물과 파인엑셀을 시험물질로 실험을 진행하였음. 식이와 에너지 항상성에 중요한 역할을 하는 호르몬인 렙틴의 수용체를 생산하는 유전자의 돌연변이를 통해 제 2형 당뇨병이 유도된 *db/db* 마우스를 이용하여 동물실험을 진행하였음
- 동물 실험은 각각 8마리씩 총 7개의 군으로 진행하였음. 식이는 일반식이(총 칼로리의 지방 함량 18%)를 사용하였으며, 자유급식과 자유음수로 사육함
- 시험 물질은 1차년도 선행 세포 연구의 결과를 바탕으로 1) 개별 추출물은 고추씨 추출물 200 mg/kg b.w. 및 파인엑셀 50 mg/kg b.w., 2) 복합물은 파인엑셀 50 mg/kg b.w.+ 고추씨 추출물 100 mg/kg b.w.(파인엑셀1:고추씨 추출물2) 및 파인엑셀 50 mg/kg b.w.+ 고추씨 추출물 200 mg/kg b.w.(파인엑셀1:고추씨 추출물4)으로 실험군을 설정하였음. 양성대조군은 제 2형 당뇨병 치료제로 널리 쓰이는 metformin을 사용하였음. 모든 시험 물질들은 경구로 마우스에게 투여하였음

Table 29. 개별 및 복합물의 동물실험 설계

Groups	Normal <sup>1)</sup>	Control <sup>2)</sup>	Metformin <sup>3)</sup>	PineXol <sup>®</sup>	고추씨 추출물	복합물 (1:2)	복합물 (1:4)
% kcal from fat	18	18	18	18	18	18	18
Metformin (mg/kg b.w.)	.	.	150	.	.	.	.
PineXol <sup>®</sup> (mg/kg b.w.)	.	.	.	50	.	50	50
Red pepper seed extracts (mg/kg b.w.)	.	.	.	.	200	100	200
Number of animal	8	8	8	8	8	8	8
Sex	male	male	male	male	male	male	male
Feeding (week)	8	8	8	8	8	8	8

<sup>1)</sup> Normal, C57BLKS/J-m+/db, 정상군

<sup>2)</sup> Control, C57BL/KsJ-db/db, 음성대조군

<sup>3)</sup> 양성대조군

## 나. 제2형 당뇨병 마우스 모델을 이용한 파인엑셀, 고추씨 추출물, 복합물의 항비만 및 체지방 감소 검증

### (1) 체중 및 사료섭취량

- 실험동물의 체중을 매주 일정시간에 8주 동안 측정함(Fig 100). 돌연변이로 렙틴 수용체가 결여된 음성대조군에서 정상군 대비 체중이 현저하게 증가함. Metformin을 급여한 양성대조군은 음성대조군에 대비 체중이 유의적으로 감소함( $p < 0.05$ ). 복합물 1:4 급여군이 체중이 다소 높은 경향을 나타내었으나 모든 실험군에서 음성대조군 대비 유의적인 체중 차이가 없음

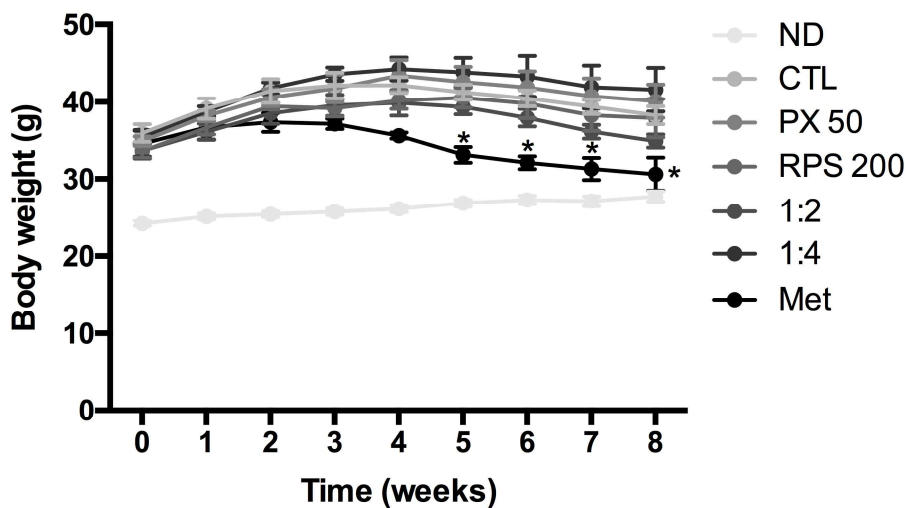


Fig 100. 개별 및 복합물을 급여한 마우스의 체중  
(\* $p < 0.05$  compared to CTL)

- 일일 사료 섭취량을 8주 동안 측정함(Fig 101). 실험동물 모두 실험기간이 진행될수록 일일 사료 섭취량이 감소하는 경향을 보임
- 파인엑셀 급여군에서 4주, 5주에서 음성대조군 대비 사료 섭취량이 유의적으로 증가하였으나(각각  $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ) 이후에 유의적인 차이를 나타내지 않음. 종합적으로 시험물질 투여가 마우스의 사료 섭취량에 크게 영향을 주지 않는 것으로 판단됨

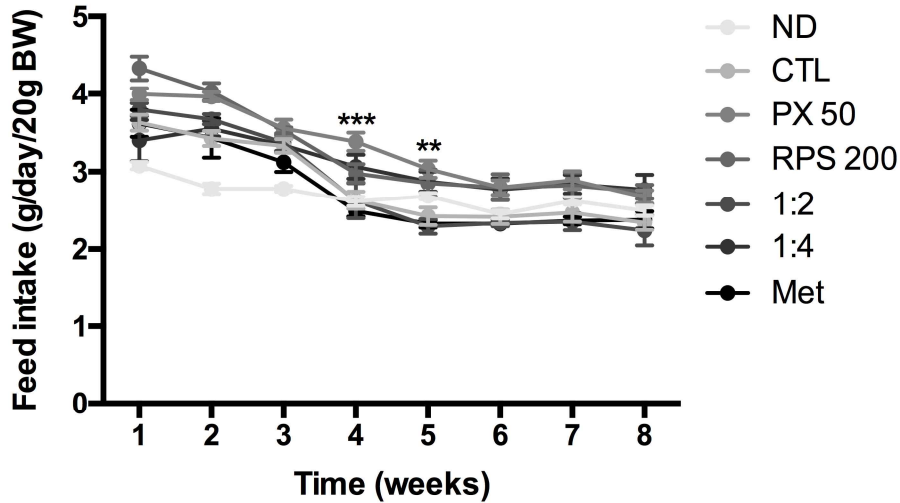
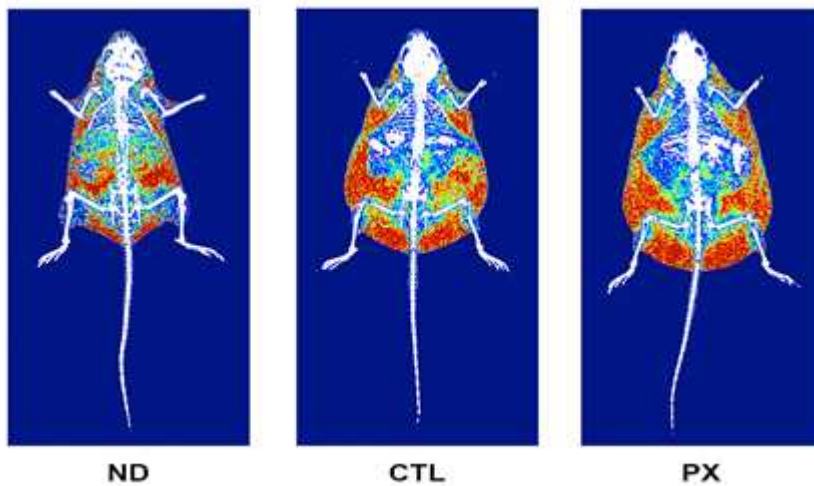


Fig 101. 개별 및 복합물을 급여한 마우스의 사료 섭취량  
 (\*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  compared to CTL)

## (2) 체성분 분석

- 시험물질 투여 종료 후(8주) 양방사선 조사장치(DEXA)를 이용하여 체지방량과 제지방량 등 체성분분석을 진행함(Fig 102). 체지방량의 경우 음성대조군에 대비 복합물 1:4 급여군에서 약간 높은 경향을, 양성대조군에서 낮은 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 없음
- 시험물질 급여에 의한 체지방량(fat mass)과 제지방량(lean mass)의 유의적인 변화는 관찰되지 않음. 즉, 시험물질은 체지방과 근육량 등 체성분 구성에 영향을 주지 않음
- 종합적으로, 제 2형 당뇨병이 유발된 마우스에게 시험물질을 8주간 급여하였을 때 체중 및 체지방량 등 체성분의 변화는 관찰되지 않음. 이는 개별 및 복합물의 섭취가 체지방 감소에 영향을 미치지 않음을 시사함



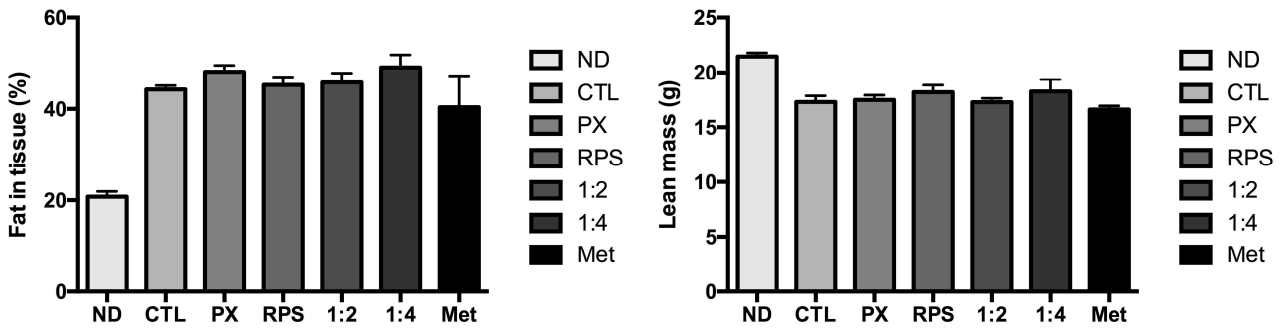


Fig 102. 개별 및 복합물의 급여에 따른 체성분 분석

### 다. 제2형 당뇨병 마우스 모델을 이용한 파인엑셀, 고추씨 추출물, 복합물의 혈당 감소 및 인슐린 저항성 개선 검증

#### (1) 간 염증지표 분석

- 개별 및 복합물을 마우스에 급여하였을 때 간에 대한 영향을 평가하기 위해 독성 및 염증 반응을 분석함(Fig 103). 간 독성 분석을 위해 혈중 aspartate aminotransferase(AST)와 alanine aminotransferase(ALT)를 분석함. 시험물질 투여는 간 독성이 유도되지 않음

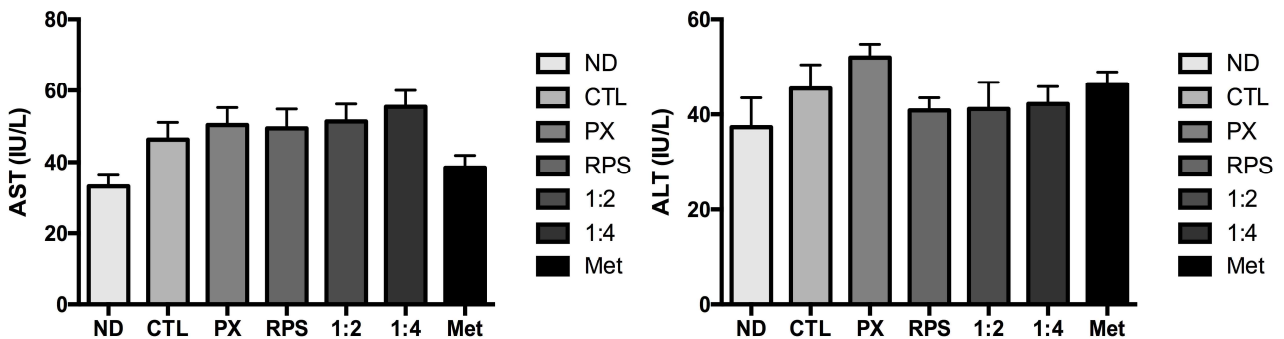


Fig 103. 개별 및 복합물의 급여에 따른 간 염증지표

#### (2) 혈당 및 인슐린 분석

- 개별 및 복합물의 혈당 개선 효과를 확인하기 위해 혈장의 공복기 혈당을 측정함(Fig 104). 2주 간격으로 4시간 공복기간을 거친 후 마우스의 꼬리에서 채혈 후 혈당측정기를 이용하여 측정하였음
- 실험 결과, 고추씨 추출물 200 mg/kg 급여군과 복합물 1:2 급여군에서 공복기 혈당이 각각  $429.4 \pm 51.1$  mg/dL,  $416.8 \pm 48.1$  mg/dL로 음성대조군 대비 약 20% 감소하였음 ( $p < 0.01$ ). 파인엑셀 급여군에서 약 15% ( $p = 0.13$ ), 1:4 복합물 급여군에서 약 18% 감소하였으나 ( $p = 0.08$ ) 유의적 차이를 나타내지 않음. 따라서 고추씨 추출물 200 mg/kg과 복합물 1:2에서 혈당 감소 효과를 확인함

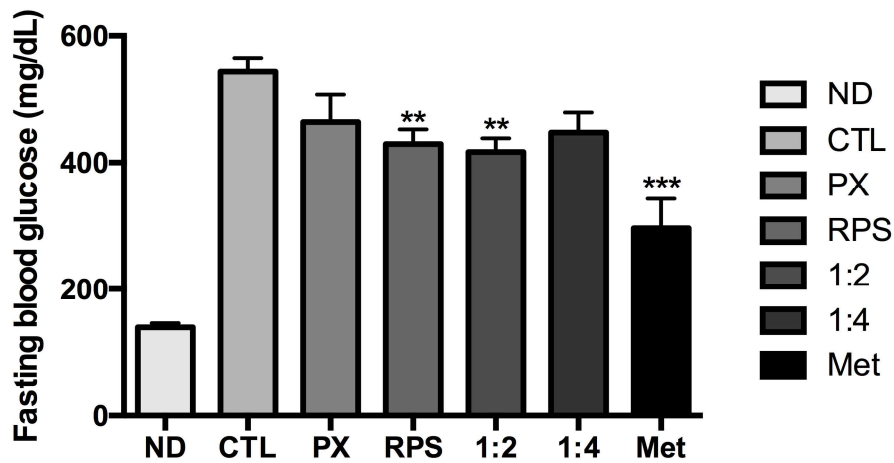


Fig 104. 개별 및 복합물의 급여에 따른 혈장 공복 혈당  
 (\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  compared to CTL)

- 공복기 혈당은 단시간의 혈당 변화를 나타내는 지표이므로 장기간 혈당 개선 효과를 확인하기 위해 혈장 당화혈색소(HbA1c)를 측정함(Fig 105)
- 실험 결과, 고추씨 추출물 200 mg/kg 급여군에서  $6.72 \pm 0.99$  %로 유의적으로 약 10% 감소하였으며( $p < 0.05$ ), 복합물 1:2 급여군에서  $5.66 \pm 1.91$  %를 나타내어 유의적으로 약 30% 감소하였음( $p < 0.001$ )
- 고추씨 추출물 200 mg/kg과 복합물 1:2의 섭취는 단기적, 장기적으로 모두 혈당 감소에 효과가 있음

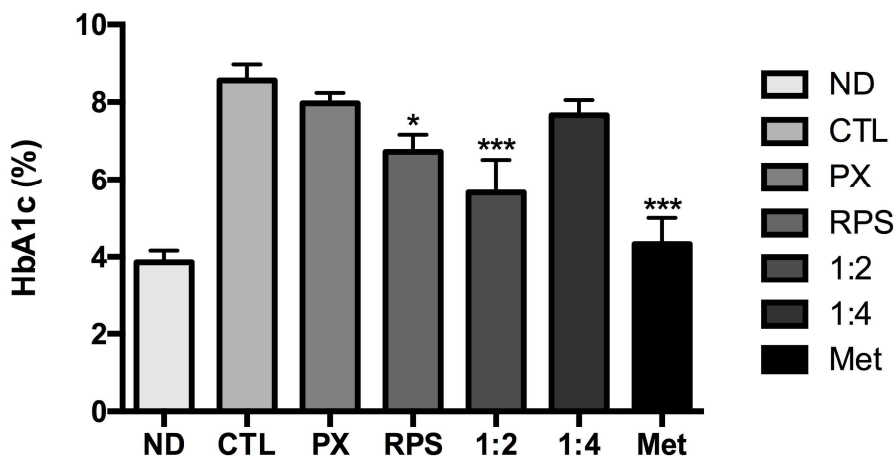


Fig 105. 개별 및 복합물의 급여에 따른 혈장 당화혈색소  
 (\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  compared to CTL)

- 제 2형 당뇨병 모델인 db/db 마우스는 인슐린 저항성 특징을 가지고 있어 혈중 인슐린의 농도가 높은 상태로 유지되는 현상을 보임. 개별 및 복합물의 인슐린 저항성 개선 효과를 확인하기 위해 db/db 마우스의 혈장 인슐린 농도를 측정함(Fig 106)
- 고추씨 추출물 200 mg/kg 급여군에서  $1.75 \pm 0.17$  mg/dL, 복합물 1:2 급여군에서  $1.63 \pm 0.15$  mg/dL로 음성대조군 대비 혈장 인슐린의 농도가 각각 17%, 23% 유의적으로 감소함(각각  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). 하지만 파인엑셀 추출물 50 mg/kg 급여군에서 인슐린 개선 효과가 나타나지 않음. 따라서 고추씨 추출물 200 mg/kg과 복합물 1:2에서 인슐린 저항성 개선 효과를 나타냄

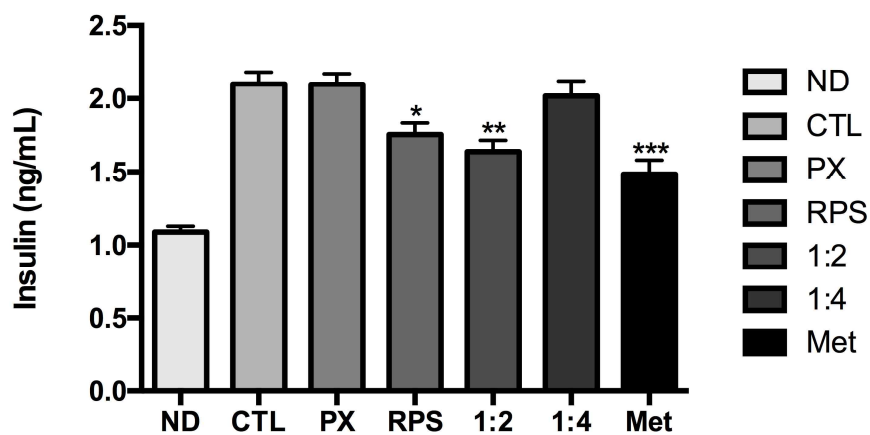


Fig 106. 개별 및 복합물의 급여에 따른 혈장 인슐린  
(\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$  compared to CTL)

- 인슐린의 정상적 기능 수행을 판단하기 위해 당을 체내에 유입한 후 시간별로 혈액을 채취 후 혈당을 측정하여 경구내당능 검사(OGTT)를 수행함(Fig 107). 실험 7주에 마우스를 4시간 절식시킨 후 꼬리에서 채혈된 혈액을 혈당측정기를 이용하여 공복기 혈당을 측정함. 그 후 50% 포도당 용액(0.1 g glucose/100 g B.W)을 경구투여 후 30분, 60분, 120분에 혈당을 측정함
- 실험 결과, 당 투여 30분 후 나타난 혈당 증가율이 대조군을 포함한 모든 급여군에서 동일한 경향을 나타냄. 따라서, 단일 및 복합물에 의한 혈당감소 효과는 인슐린 민감도가 개선됨에 따른 효과가 아닌 간의 포도당신생합성 감소에 의한 효과로 판단됨. 이 결과는 선행 연구에서 수행된 세포실험 결과와 일치함

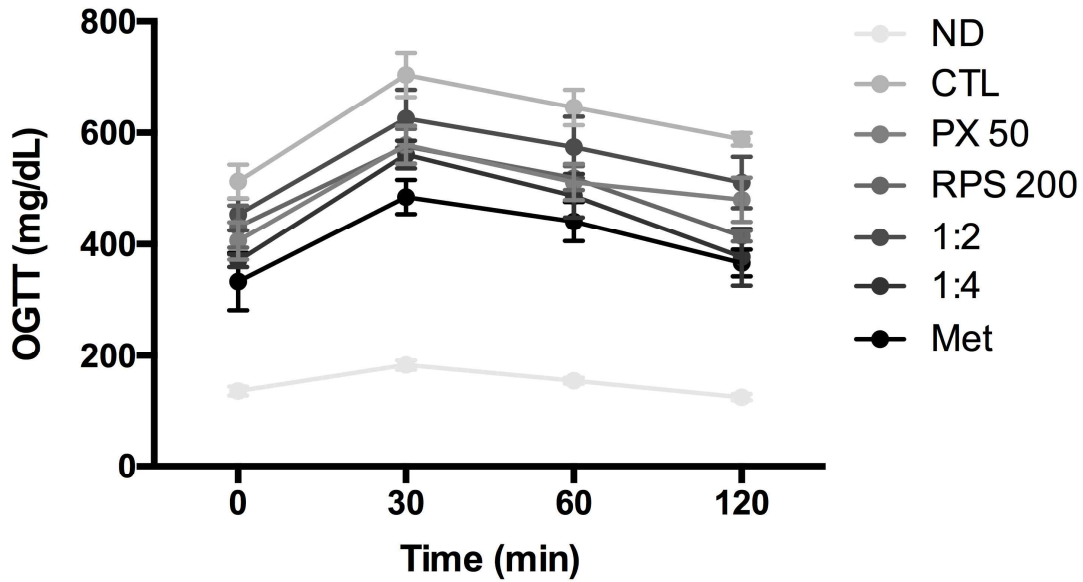


Fig 107. 개별 및 복합물의 급여에 따른 경구내당능

### (3) 간의 포도당신생합성 기전 분석

- 단일 및 복합물에 의한 혈당 감소 세부기전을 구명하기 위해 간의 포도당신생합성 효소를 분석함(Fig 108). G6Pase와 PEPCK는 간에서 당신생합성을 조절하는 주요 인자이며, 이들의 활성이 증가할 경우 간에서 당신생합성을 촉진함. FoxO1은 당신생합성과정에 관여하는 인자들인 G6Pase와 PEPCK의 발현을 조절하는 전사인자이며, 인산화가 되면 G6Pase와 PEPCK의 활성을 억제시켜 당신생합성과정을 방해함. AMPK는 당신생합성과정을 조절하는 전사인자인 FoxO1의 발현을 조절하는 인자이며, 인산기가 달라붙어 인산화가 진행되면 FoxO1의 인산화를 촉진시켜 당신생합성과정을 억제함
- 실험 결과, 고추씨 추출물 200 mg/kg 급여군, 복합물 1:2와 1:4 급여군에서 음성대조군에 대비 AMPK의 인산화가 증가함( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ )
- AMPK의 하위 기전인 FoxO1의 인산화를 측정된 결과, 고추씨 추출물 200 mg/kg 급여군, 복합물 1:2 급여군에서 인산화가 증가함( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ )
- FoxO1에 의해 발현이 조절되며 당신생합성과정에 직접적으로 기여하는 G6Pase와 PEPCK의 발현량을 확인한 결과, 고추씨 추출물 200 mg/kg 급여군과 복합물 1:2 급여군에서 유의적으로 감소함( $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ )
- 고추씨 추출물 200 mg/kg 급여군과 복합물 1:2 급여군에서 당신생합성이 감소하여 간에서의 포도당 합성이 억제됨. 이는 고추씨 추출물과 복합물이 당대사 조절 기전에 영향을 줄 수 있음을 시사함

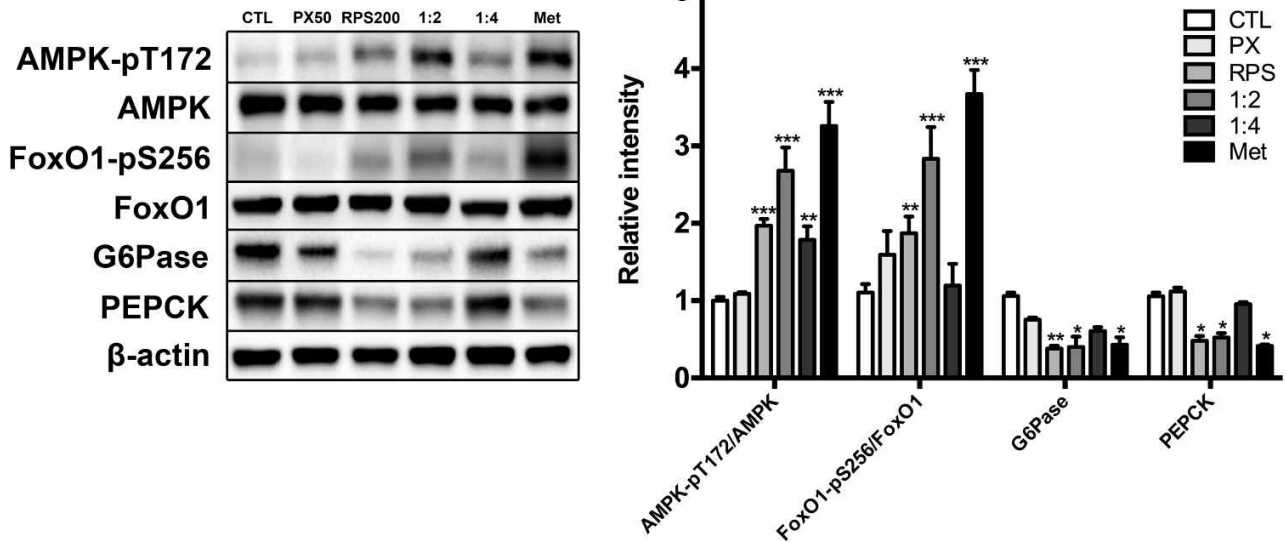


Fig 108. 개별 및 복합물의 급여에 따른 간의 포도당신생합성  
 (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  compared to CTL)

#### (4) 이상지질혈증 분석

- 단일 및 복합물의 이상지질혈증 개선 효과를 확인하기 위해 혈중 중성지질과 유리지방산을 측정하였음(Fig 109)
- 혈중 중성지질의 경우, 고추씨 추출물 200 mg/kg 급여군에서  $103.9 \pm 6.73$  mg/dL으로 음성대조군 대비 약 24% 유의적으로 감소함( $p < 0.05$ ). 복합물 1:2 급여군에서  $91.22 \pm 23.01$  mg/dL로 유의적으로 약 33% 감소함( $p < 0.01$ ). 복합물 1:2 급여군에서  $80.29 \pm 22.75$  mg/dL을 나타내어 유의적으로 약 41% 감소함( $p < 0.001$ ). 파인엑셀 50 mg/kg 급여군에서 혈중 중성지질의 변화 없음
- 혈중 유리지방산의 경우, 고추씨 추출물 200 mg/kg 급여군에서  $0.9855 \pm 0.126$  mEq/L으로 약 19% 감소하였으나 유의적인 차이가 나타나지 않음( $p = 0.14$ ). 복합물 1:2 급여군에서  $0.843 \pm 0.160$  mEq/L로 음성대조군에 비해 유의적으로 약 30% 감소함( $p < 0.01$ ). 파인엑셀 50 mg/kg 급여군에서 혈중 유리지방산의 변화 없음
- 위 결과를 종합하여, 고추씨 추출물 200mg/kg과 복합물 1:2에서 이상지질혈증 개선의 가능성을 확인함



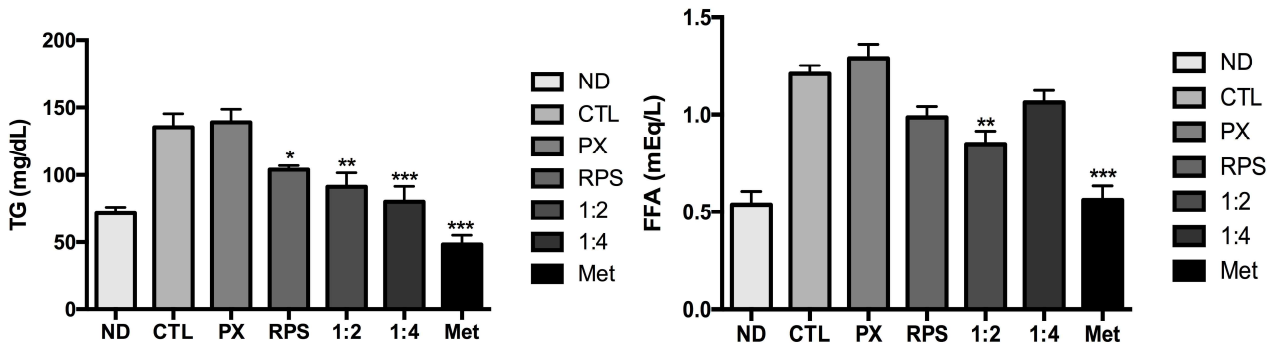


Fig 109. 개별 및 복합물의 급여에 따른 혈중 중성지방과 유리지방산  
 (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  compared to CTL)

### (5) 혈중 염증인자 분석

- 단일 및 복합물의 염증반응 개선을 확인하기 위해 비만한 제 2형 당뇨병이 유도된 db/db 마우스의 지방세포에서 분비되는 TNF- $\alpha$ 와 만성 염증성 인자인 IL-6를 측정함 (Fig 110)
- TNF- $\alpha$ 의 경우, 고추씨 추출물 200 mg/kg 급여군과 복합물 1:2 급여군에서 각각  $146.7 \pm 16.63$  pg/ml,  $141.5 \pm 24.75$  pg/ml로 음성대조군 대비 유의적으로 약 20% 감소하였음(모두  $p < 0.05$ ). 파인엑셀 50 mg/kg 급여군에서  $154.9 \pm 22.73$  pg/ml로 약 18% 감소하였으나 유의적인 차이가 없음( $p = 0.12$ )
- IL-6의 경우, 복합물 1:2 급여군에서  $90.41 \pm 17.71$  pg/ml로 유의적으로 약 40% 감소함( $p < 0.001$ ). 고추씨 추출물 200 mg/kg 급여군은  $129.1 \pm 25.21$  pg/m 약 22% 감소하였으나 유의적인 차이를 나타내지 않음( $p = 0.09$ )
- 따라서 고추씨 추출물 200 mg/kg과 복합물 1:2에서 이상지질혈증 개선 효과 뿐만 아니라 염증반응 개선 가능성을 확인함

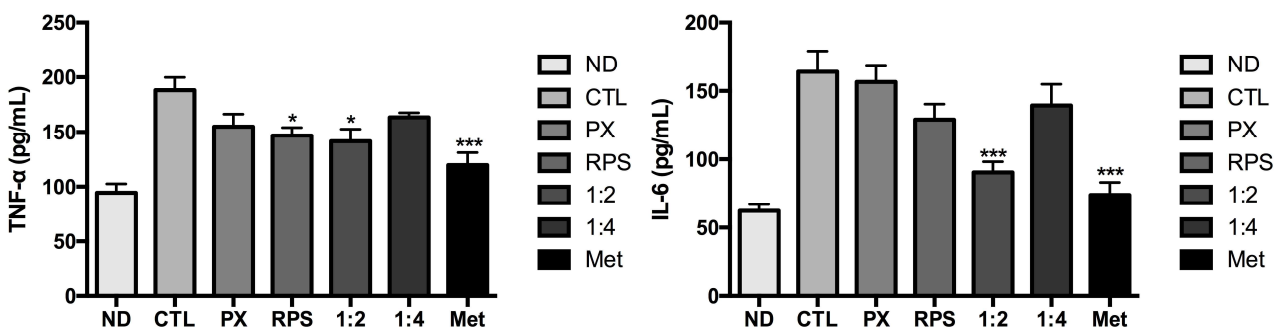


Fig 110. 개별 및 복합물의 급여에 따른 혈중 염증인자  
 (\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$  compared to CTL)

# 제 6 절 인체적용시험을 통한 체지방 감소 효과 확인

## 1. 인체적용시험 연구기관 선정

- 인체적용시험명 : 과체중인 성인에서 체중 및 체지방 감소에 미치는 RPE 및 RPEC의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
- 섭취기간 : 12주
- 시험기관 : 성빈센트병원 가정의학과 송상욱 교수
- CRO 기관 : 네오뉴트라
- 원외분석기관 : 녹십자랩셀

Table 30. 인체적용시험 수행기관 계약서

<p><b>중립적용시험 CRO 계약서</b></p> <p>본 계약은 당사(이하 "CRO")와 "신"이 의뢰한 인체적용시험(이하 "시험")을 수행하기 위하여 체결된 것으로, 본 계약의 목적은 신의 인체적용시험을 성공적으로 수행하는 데 있다.</p> <p><b>제 1 조 목적</b></p> <p>본 계약의 목적은 신이 의뢰한 인체적용시험을 성공적으로 수행하는 데 있다.</p> <p><b>제 2 조 범위</b></p> <p>본 계약의 범위는 신이 의뢰한 인체적용시험의 수행을 포함한다.</p> <p><b>제 3 조 기간</b></p> <p>본 계약의 기간은 신이 의뢰한 인체적용시험의 수행 기간을 포함한다.</p> <p><b>제 4 조 비용</b></p> <p>본 계약의 비용은 신이 의뢰한 인체적용시험의 수행 비용을 포함한다.</p>	<p><b>실행기관(병원) 계약서</b></p> <p>본 계약은 신(이하 "실행기관")과 신(이하 "CRO")이 체결한 것으로, 실행기관의 목적은 신의 인체적용시험을 성공적으로 수행하는 데 있다.</p> <p><b>제 1 조 목적</b></p> <p>본 계약의 목적은 신이 의뢰한 인체적용시험을 성공적으로 수행하는 데 있다.</p> <p><b>제 2 조 범위</b></p> <p>본 계약의 범위는 신이 의뢰한 인체적용시험의 수행을 포함한다.</p> <p><b>제 3 조 기간</b></p> <p>본 계약의 기간은 신이 의뢰한 인체적용시험의 수행 기간을 포함한다.</p> <p><b>제 4 조 비용</b></p> <p>본 계약의 비용은 신이 의뢰한 인체적용시험의 수행 비용을 포함한다.</p>	<p><b>원외분석기관 계약서</b></p> <p>본 계약은 신(이하 "원외분석기관")과 신(이하 "CRO")이 체결한 것으로, 원외분석기관의 목적은 신의 인체적용시험을 성공적으로 수행하는 데 있다.</p> <p><b>제 1 조 목적</b></p> <p>본 계약의 목적은 신이 의뢰한 인체적용시험을 성공적으로 수행하는 데 있다.</p> <p><b>제 2 조 범위</b></p> <p>본 계약의 범위는 신이 의뢰한 인체적용시험의 수행을 포함한다.</p> <p><b>제 3 조 기간</b></p> <p>본 계약의 기간은 신이 의뢰한 인체적용시험의 수행 기간을 포함한다.</p> <p><b>제 4 조 비용</b></p> <p>본 계약의 비용은 신이 의뢰한 인체적용시험의 수행 비용을 포함한다.</p>
CRO 계약서	수행기관(병원) 계약서	원외분석기관 계약서

## 2. 인체적용시험 디자인

### 가. 인체적용시험 디자인 검토

- 인체적용시험의 성공률을 제고하기 위해 체지방 감소 기능성으로 기 인정받은 원료 또는 해외 원료의 인체적용시험 디자인 및 식품의약품안전처의 인체적용시험 가이드라인을 참고하여 인체적용시험 디자인을 선정함

Table 31. 체지방 감소 관련 인체적용시험 디자인 비교

	시서스 1	시서스 2	시서스 3
<b>디자인</b>	RCT, DB	RCT, DB	RCT, DB
<b>대상자 선정기준</b>	과체중(BMI 25-29), 비만(BMI 30 이상)의 성인 남녀 *BMI>25, 허리둘레>85.5cm	20세~60세의 BMI 25~29.9 kg/m <sup>2</sup> 성인 남녀	과체중 또는 비만인 19~50세의 성인남녀 (BMI>25)
<b>대상자 제외기준</b>	-격렬한 운동, 체중감량 약물 사용자	-당뇨병 환자 -임산부, 수유부 제외	-비정상적 공복 혈당 -혈압에 문제 있는 환자

	-임산부 -혈청 지질에 영향을 미칠 수 있는 환자 또는 병력을 가진 자 -약물, 알코올 남용 병력	-체중감량 관련 약 또는 식이요법을 섭취하는 사람	-임산부, 수유부 -격렬한 운동, 체중감량 약물 사용자 -혈청 지질에 영향을 미칠 수 있는 환자 또는 병력을 가진 자 -약물, 알코올 남용 병력
<b>섭취기간</b>	8주	8주	8주
<b>바이오마커</b>	체지방률(BIA) 신체계측지표 : 체중, 체질량지수(BMI), 허리둘레 혈액마커 : 비만관련 호르몬(Adiponectin, Leptin), 총콜레스테롤(Total cholesterol), 중성지방(Triglyceride), LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, CRP, 공복 혈당	체지방률(DEXA, BIA) 신체계측지표 : 체중, 체질량지수(BMI), 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리-엉덩이둘레비(WHR) 혈액마커 : 비만관련 호르몬(Adiponectin, Leptin), 총콜레스테롤(Total cholesterol), 중성지방(Triglyceride), LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 혈압(수축기, 확장기), 공복 혈당	체지방(BIA) 시험관시험 (항산화) FRAR, Folin, DPPH 신체계측지표 : 체중, 체질량지수(BMI) 혈액마커 : TBARS, carbonyls, 총콜레스테롤(Total cholesterol), 중성지방(Triglyceride), LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 공복 혈당, 혈장 MDA, 요중 MDA, 혈장 5-HT, 혈장크레아티닌
	<b>그린커피빈</b>	<b><i>L. gasseri</i></b>	<b>펑거루트</b>
<b>디자인</b>	RCT, DB	RCT, DB	RCT, DB
<b>대상자 선정기준</b>	BMI 25 이상 30 kg/m <sup>2</sup> 미만, 만 20세 이상 60세 이하의 성인남녀	BMI 23 kg/m <sup>2</sup> 이상, 공복 혈당이 100 mg/dL 이상인 19~60세의 성인 남녀	BMI 25~29.9 kg/m <sup>2</sup> 인 만 20세 이상 65세 이하 성인 남녀
<b>대상자 제외기준</b>	-뇌혈관, 심장계통 질환이 있는자 -1개월 이내 체중에 영향을 미치는 약 등을 복용한 자 -조절이 어려운 고혈압, 당뇨, 갑상선질환 등으로 치료중인 자 -안전성검사(AST, ALT 등) 결과에 이상이 있는 경우 -3개월 이내 비만 프로그램, 다이어트 식품 복용한자, 또는 1개월	-3개월 이내에 체중이 5% 이상 변한 자 -지질 저하, 당뇨병 관련 약물복용자, 환자 -내분비, 심혈관계, 갑상선, 만성 간질환자 -체중에 영향을 줄 수 있는 약물복용자 -체중 감량 수술, 프로바이오틱스 또는 항생제 1개월 이내 투여자	-혈압 SBP 160이상, DBP 100 hg 이상이거나 고혈압 치료제(베타차단제), 이노제를 복용하는 고혈압 환자 -공복혈당 126 mg/dL 이상, 무작위 혈당 200 mg/dL 이상, 인슐린 복용 당뇨병 환자 -안전성검사(ALT, AST 등) 결과에 이상이 있는 경우 -임산부, 수유부, 3개월 내 임상시험 참여자

	이내 타 임상시험에 참여한 자		
<b>섭취기간</b>	12주	12주	12주
<b>바이오마커</b>	체지방, 체지방(DEXA), 내장, 피하지방, 총복부지방, 내장/피하지방 면적비(CT scan) 신체계측지표 : 체중, 체질량지수(BMI), 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리/엉덩이 둘레비 혈액 및 뇨중 마커 : 아니포넥틴, 랩틴, CRP, 총콜레스테롤(Total cholesterol), 중성지방(Triglyceride), LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤	체지방, 근육량, 내장, 피하지방(CT scan), 산소 소비 및 기초 신진대사율(간접 열량 측정법) 신체계측지표 : 체중, 체질량지수(BMI), 허리둘레, 엉덩이둘레 혈액 및 뇨중 마커 : 인슐린, 헤모글로빈A1c, FBS, 식후2시간혈당, 총콜레스테롤(Total cholesterol), 중성지방(Triglyceride), LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 혈압(수축기, 확장기), 심전도, 일반안전성검사(GOT, GPT 등)	체지방량(DEXA), 내장, 피하지방(CT scan) 신체계측지표 : 체중, 허리둘레

## 나. 인체적용시험 섭취량 설정 근거

### (1) 인체적용시험 dose 결정

- 동물실험에서 고추씨 추출물 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 체중이 감소하였으며, 특히, 고추씨 200 mg/kg 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 유의적으로 감소함
- 파인엑솔 50 mg/kg 투여군은 고지방식이 대조군에 비해 감소하는 경향을 나타냈으며, 복합 추출물 고추씨 추출물 200 mg/kg + 파인엑솔 50 mg/kg 투여군은 고지방식이대조군에 비해 감소하는 경향을 보임. 복합 추출물의 시너지 효과는 다른 동물 모델을 통해 더 연구하여야 할 것으로 사료됨
- 동물실험에서 체중과 체지방량이 가장 크게 감소한 고추씨 200 mg/kg 투여군을 기준으로 인체적용시험 섭취량을 설정하고자 함

### (2) 인체적용시험 시험군1, 시험군2(고추씨/파인엑솔 2:1 비율)의 배합비 설정

- 고지방 식이모델에서는, 고추씨 단독군에서 체지방 감소라는 효과를 비롯하여 기전적으로는 지방합성 억제, 혈액 지질대사 개선 등의 효과를 보였음. 당대사 모델에서는, 비록 체지방 감소의 효과는 없었지만, 고추씨 단독군과 고추씨/파인엑솔 복합군에서 간에서의 당신생합성 억제, 혈액 지질대사 개선, 비만조직의 대표적인 증상인 염증개선의 효과를 보임

- 실제 생활에서 비만을 유발하는 인자는 매우 다양함. 비만 효과를 보기 위한 동물모델은 고지방식이 모델이 대표적이지만, 본 실험의 당대사 모델(= 사람에서는 고지방식이 아닌 음식을 계속 먹어 비만이 되는 현상과 같음)에서 기전적으로 비만의 요인 혹은 비만에 의하여 나타나는 증상(염증 감소: TNF- $\alpha$ , IL-6 감소/ 간 신생합성 억제: AMPK, FoxO1의 인산화 증가, G6pase, PEPCK의 발현량이 감소)이 두 군에서 모두 개선되는 효과를 확인함

→ 본 동물실험을 근거로, 실제 여러 원인(고지방 섭취 혹은 과식 등)으로 일어나는 비만을 효과적으로 개선하기 위하여 고추씨 단독군과 고추씨/과인엑셀 복합군으로 나누어 인체적용시험을 디자인하였음

#### 다. 인체적용시험 디자인

- 다수의 개별인정원료의 인체적용시험을 진행했던 네오뉴트라와 지속적인 협의를 통해 인체적용시험 디자인을 확정하였으며 연구자 요청 및 인체적용시험 대상자 모집의 촉구를 위해 디자인을 변경함
- 인체적용시험 번호 : NOVA\_RPEC
- 인체적용시험 제목 : 과체중인 성인에서 체중 및 체지방 감소에 미치는 RPE 및 RPEC의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험
- 인체적용시험 대상 : 과체중인 성인 남, 녀
- 인체적용시험 목적 : 본 인체적용시험은 과체중인 성인 남, 녀를 대상으로 고추씨추출물(RPE) 또는 고추씨추출물등복합물(RPEC)을 섭취하였을 때 대조식품(placebo)과 비교하여 체지방 및 체중 개선에 미치는 유효성 및 안전성을 평가하기 위하여 계획됨
- 디자인 : 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조, 단일기관
- 인체적용시험 섭취기간 : 12주
- 인체적용시험 대상자 수 : 총 120명
- 인체적용시험용 식품 및 섭취방법
  - \* 시험식품1 : 고추씨추출물 (RPE)  
1일 2회, 1회 2정을 식사 전 섭취(RPE로써 1,450 mg/일)
  - \* 시험식품2 : 고추씨추출물등 복합물 (RPEC)  
1일 2회, 1회 2정을 식사 전 섭취(RPEC로써 1,450 mg/일)
  - \* 대조식품 : placebo  
시험군과 동일한 방법으로 섭취

Table 32. 인체적용시험 대상자 수

	시험군1 (RPE)	시험군2 (RPEC)	대조군 (Placebo)	총 시험대상자 수
최종 평가 레수 (PP set)	29	29	29	87
Drop-Out(27%) 고려예수	40	40	40	120

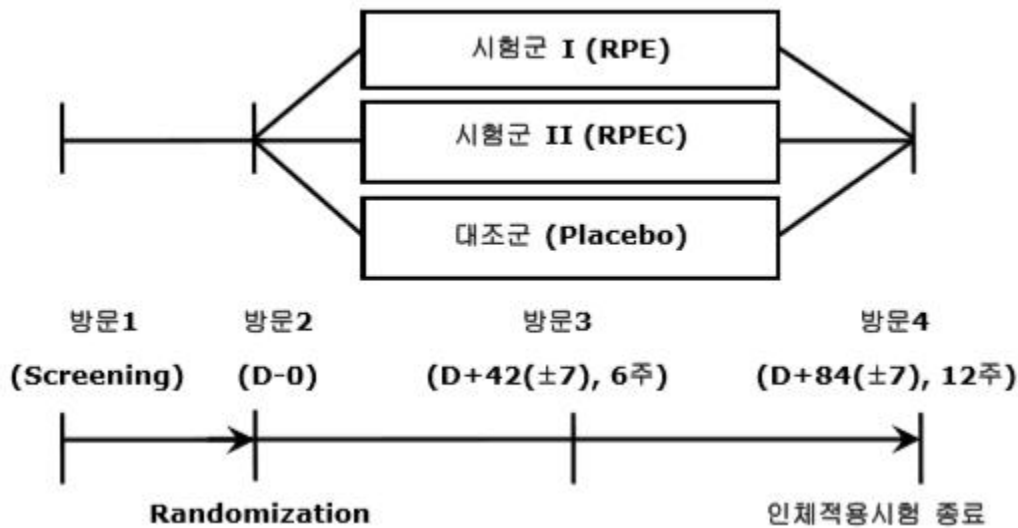


Fig 111. 인체적용시험 설계

- 인체적용시험대상자(또는 법정대리인)는 자의로 인체적용시험 동의서에 서명 후, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 I 또는 시험군 II 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정함. 배정된 인체적용시험대상자는 12주간 시험식품 I 또는 시험식품 II 또는 대조식품을 섭취함

**(1) 선정기준**

- 만 20세 이상, 만 65세 이하인 자
- 체질량지수(BMI)가 25 kg/m<sup>2</sup> 이상, 30 kg/m<sup>2</sup> 미만인 자
- 인체적용시험이 시작되기 전에 본 인체적용시험의 참여를 동의하고, 서면 동의서(Informed consent)를 작성한 자

**(2) 제외기준**

- 1) 최근 6개월 이내에 중증의 뇌혈관 질환(뇌경색, 뇌출혈 등), 심장 질환(협심증, 심근경색, 심부전, 치료를 필요로 하는 부정맥)이 있는 자 (단, 뇌혈관 질환, 심장질환의 병력이 있으나 임상적으로 안정된 시험대상자의 경우는 시험자 판단에 의해 인체적용시험에 참여할 수 있음)
- 2) 최근 1개월 이내에 체중에 영향을 미치는 약물(흡수저해제 및 식욕억제제, 비만개선 관

련 건강기능식품/보충제, 우울증 등의 정신과적인 약물, 베타차단제, 이노제, 피임약, 스테로이드제제, 여성호르몬제)를 복용하고 있는 자

- 3) 조절되지 않는 고혈압 환자 (혈압이 160/100 mmHg 이상, 인체적용시험대상자 10분 안정 후 측정기준)
- 4) 공복 혈당이 126 mg/dl 이상이거나 무작위 혈당이 200 mg/dl 이상인 자 또는 경구 혈당 강하제 또는 인슐린을 복용하고 있는 당뇨병 환자
- 5) TSH 0.1  $\mu$ U/ml 이하이거나 10  $\mu$ U/ml 이상인 자
- 6) Creatinine이 시험기관 정상 상한치의 2배 이상인 자
- 7) AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 시험기관 정상 상한치의 3배 이상인 자
- 8) 속쓰림, 소화불량 등의 심한 위장관 증상을 호소하는 자
- 9) 병력 조사 등을 통해 알코올 사용 ■ 유발 장애, 심장질환, 중추 신경 장애 등으로 입원 및 약물 치료, 재활치료 중인 자
- 10) 근골격계 질환으로 운동을 할 수 없을 것으로 판단되는 자
- 11) 고추씨에 민감하거나 알레르기가 있는 자
- 12) 최근 3개월 이내에 상업적인 비만프로그램에 참여한 자
- 13) 최근 1개월 이내에 다른 임상시험에 참여하였거나 참여할 계획이 있는 자
- 14) 임신 중이거나 본 인체적용시험 기간 동안 임신 계획이 있는 사람 또는 수유부
- 15) 기타 사유로 시험자가 부적합하다고 판단한 자

### (3) 유효성 평가

- 1차 유효성 평가 변수

- 1) DEXA를 통한 체지방률

- 2차 유효성 평가 변수

- 1) 체중
- 2) 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리/엉덩이 둘레비
- 3) 체질량지수(BMI)
- 4) DEXA를 통한 체지방량, 체지방량
- 5) CT를 통한 내장지방 면적, 피하지방 면적, 총 복부지방 면적, 내장/피하지방 면적비
- 6) CT를 이용한 지방간의 측정(간(HU), 비장(HU), 간과 비장의 HU 차이 (Liver minus Spl een), 간과 비장의 HU 비 (Ratio Between Liver and Spleen))
- 7) 혈중 지질: Total Cholesterol, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, Triglyceride
- 8) Adiponectin, Leptin
- 9) hs-CRP

### (4) 안전성 평가

- 1) 이상반응
- 2) 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)
- 3) 활력징후(혈압, 맥박)

## (5) 통계분석

### (가) 1차 유효성 평가변수

- 1차 유효성 평가변수인 DEXA를 통해 측정된 체지방률의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 시험군 I과 대조군, 시험군 II와 대조군 간의 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 단, 정규성이 심각하게 위배되는 경우 로그변환방법(logarithm transformation) 등의 변수변환을 실시한 후 검정하거나 비모수검정법인 Wilcoxon rank sum test를 실시할 수 있음

### (나) 2차 유효성 평가변수

- 2차 유효성 평가변수인 체중, 허리둘레, 엉덩이둘레, 허리/엉덩이 둘레비, 체질량지수(BMI), DEXA를 통해 측정된 체지방량, 제지방량, CT를 통해 측정된 내장지방 면적, 피하지방 면적, 총 복부지방 면적, 내장/피하지방 면적비, 간(HU), 비장(HU), 간과 비장의 HU 차이 (Liver minus Spleen), 간과 비장의 HU 비 (Ratio Between Liver and Spleen), 혈중 지질(Total Cholesterol, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol, Triglyceride), Adiponectin, Leptin, hs-CRP의 섭취 전후 변화의 정도는 Paired t-test를 이용하여 분석하고, 각 시점에서의 시험군 I과 대조군, 시험군 II와 대조군 간의 변화의 정도는 ANCOVA와 Two sample t-test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가한다. 단, 정규성이 심각하게 위배되는 경우 로그변환방법(logarithm transformation) 등의 변수변환을 실시한 후 검정하거나 비모수검정법인 Wilcoxon rank sum test를 실시할 수 있음

### (다) 안전성 평가변수-이상반응

- 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 이상반응(treatment-emergent adverse events, TEAEs)은 MedDRA preferred term에 따라 Coding하며, 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상반응을 도표화한 후 발생률을 산출하여 평가한다. 각 군간 이상반응이 발생한 인체적용시험대상자의 비율을 계산하고 카이제곱검정(Chi-square test) 또는 피셔의 정확검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석함

### (라) 안전성 평가변수-임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)

- 혈액학적 및 혈액화학적 검사치와 같이 연속형(Continuous type)자료의 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 시험군 I과 대조군, 시험군 II와 대조군 간의 비교는 Two sample t-test를 실시하여 분석한다. 뇨검사의 일부 측정 변수의 경우는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교

### (마) 안전성 평가변수-활력징후(맥박, 혈압)

- 활력징후(맥박, 혈압)에 대하여 해당 방문 시 검사하여 섭취 전과 후의 차이에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하고, 시험군 I과 대조군, 시험군 II와 대조군 간의 비교는 Two sample t-test를 실시하여 분석



Table 33. 인체적용시험 진행 일정표

Period		Screening <sup>1)</sup>	Active Treatment <sup>2)</sup>		
Visit		1	2	3	4
Week		-2	0	6	12
Window period(day) <sup>2)</sup>				±7	±7
사전동의서		✓			
인구학적 조사 <sup>3)</sup>		✓			
반려/약물투여력 조사 <sup>4)</sup>		✓	✓		
혈액징후(혈압, 맥박) 측정		✓		✓	✓
O <sub>2</sub> 포화도 검사		✓		✓	✓
임상병리검사 <sup>5)</sup>		✓			✓
음신반응검사 <sup>5)</sup>		✓			
스피 및 신체활동 기록 <sup>6)</sup>		✓	✓	✓	
스시일지, 섭취빈도, 신체활동량 조사 <sup>6)</sup>			✓	✓	✓
스체계측	신장	✓			
	체중 <sup>7)</sup>	✓	✓	✓	✓
BMI(Body Mass Index)		✓		✓	✓
허리/엉덩이 둘레 측정 <sup>7)</sup>			✓	✓	✓
DEXA			✓		✓
CT(복부, 간) <sup>8)</sup>			✓		✓
hs-CRP, Adiponectin, Leptin 검사 <sup>5)</sup>		✓		✓	✓
Lipid 검사 <sup>9)</sup>		✓		✓	✓
순경기준/저외기준 확인		✓	✓		
두적위배정			✓		
사람식품 및 대조식품 처방			✓	✓	
O <sub>2</sub> 심반응 확인				✓	✓
순응도 확인 <sup>10)</sup>				✓	✓
병용약물 및 병용요법 변화 확인				✓	✓

- 1) 스크리닝 방문 후 2주일 이내 방문2가 시행되어야 한다. 방문1의 검사 결과가 모두 확인되는 경우, 방문1과 방문2를 동시에 실시할 수 있음
- 2) 방문3의 방문일은 지정된 날짜 전·후 7일을 허용하며, 방문4의 지정된 날짜 전·후 7일을 허용
- 3) 방문1에 인체적용시험대상자의 이니셜, 성별, 생년월일, 연령, 결혼상태, 직업, 음주여부, 흡연여부를 조사하여 기록
- 4) 방문1, 2에 스크리닝 시점을 기준으로 6개월 이내의 외과적 수술력을 포함한 병력과 1개월 이내의 약물투여력을 조사하여 기록
- 5) 인체적용시험대상자는 채혈하기 전날 8시간 금식상태로 내원하여 다음의 항목을 검사할 시험자의 판단에 따라 비정상적인 결과에 대해 임상병리검사 등을 재검사를 실시함. 방문

1의 임상병리검사는 스크리닝 방문 기준으로 2주 이내 검사 결과가 있을 경우 대체 가능하다(단, 임신반응 검사 제외). 방문1의 임상병리검사는 BMI 확인 후 선정기준에 해당하는 사람만 실시함

- 혈액학적 검사: RBC, Hb, Hct, WBC, Platelet, Neutrophil, Lymphocyte, Monocyte, Eosinophil, Basophil, MCV
  - 혈액화학적 검사: AST(GOT), ALT(GPT), Protein, Albumin, Glucose, Total bilirubin, ALP, Na, K, Cl, P, Calcium, Creatinine, BUN, Uric acid,  $\gamma$ -GTP • 소변검사: SG, pH, Leukocyte, Nitrite, Protein, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Erythrocyte
  - 임신반응검사: Urine HCG (※ 가임기 여성만 해당)
  - 갑상선호르몬검사: TSH (방문1에서만 시행)
- 6) 방문1, 2, 3에서는 인체적용시험대상자에게 식이 및 신체활동에 대한 내용을 교육하고 (평소보다 500kcal/day 감량하여 섭취, 매일 300kcal 이상에 해당하는 운동 실시), 시험 담당자는 방문 전 3일 이내에 고지방식이, 고탄수화물식이, 음주를 주의하여 섭취할 것과 고열량 간식이나 야식을 절제하도록 인체적용시험대상자를 교육해야함. 다음 방문 시 제출해야 하는 식사일지 및 신체활동 일지를 배부하여 방문2, 3, 4에 회수하여 확인함. 기록된 인체적용시험대상자의 식사일지 및 신체활동 일지를 통해 1일 에너지 섭취량, 운동을 통해 소모되는 신체활동량, 고추와 소나무껍질 관련 식품의 섭취빈도를 조사
- 7) 인체적용시험대상자는 8시간 금식상태에서 체중, 허리/엉덩이 둘레를 측정함
- 8) 복부 CT : 영상의 요추 4~5번 위치를 기준으로 Hounsfield number -190~-30에 속하는 부위에서 내장지방 면적과 복부 총지방면적을 측정. 복부와 배부의 근육을 경계로 안쪽을 내장지방 조직으로, 바깥쪽을 복부피하지방조직으로 나누며, 복부피하지방 면적은 총 복부지방 면적에서 내장지방 면적을 차감하여 계산함  
간 CT : 간과 비장을 모두 포함한 1개의 비조영증강 복부 CT 영상에서 간의 우엽과 비장에서 혈관을 피해 균질적인 곳으로 선택한 관심영역(regions of interest, ROI)에서 CT attenuation values(Hounsfield units)를 3회 측정하여 그 평균값을 각각의 CT attenuation number로 함. 이때 각 관심영역의 크기는 120 mm<sup>2</sup>으로 동일하게 지정함
- 9) hs-CRP, Adiponectin, Leptin 검사 및 Lipid(Total Cholesterol, Triglyceride, HDL-Cholesterol, LDL-Cholesterol)검사는 임상병리검사, 임신반응검사 확인 후 선정/제외기준에 해당하는 인체적용시험대상자만 실시함
- 10) 방문3, 4에 인체적용시험대상자가 지참하고 온 인체적용시험용 식품의 잔량을 비교하여 인체적용시험담당자 또는 관리약사가 점검 및 기록함 [‘인체적용시험용 식품 처방 날(처방 당일은 섭취방법에 상관없이 1일 섭취량(4정)을 모두 섭취) ~ 다음 방문 전날’ 섭취]

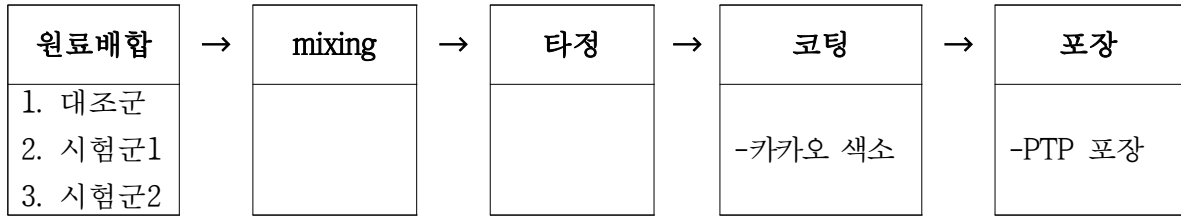
### 3. 인체적용시험 개시 및 진행

#### 가. 인체적용시험 개시

##### (1) 인체적용시험용 시험식품 제작

가) 인체적용시험용 시험식품

① 시험식품 생산공정도



② 대조군 및 시험군 원료 배합비 설정

- 인체적용시험용 샘플을 만들기 위해 대조군, 시험군1, 시험군2의 배합비를 각각 설정  
상세 배합은 기밀사항이라 외부로 공개가 어려움



Table 34. 인체적용시험용 시험식품 배합비 (1차, 2g/일 섭취)

	원 료 명	배합비율(%)	합량(mg)	1일 총섭취량
	대조군	덱스트린(DE-17~19,9)	46,5000%	465.0000
결정셀룰로오스(M101)		50,0000%	500.0000	1000.0000
HPMC(국산-롯데)				
스테아린산마그네슘(싱가포르산)				
이산화티타늄(Tio2)				
카카오색소(JS-200)				
미바셋-엑상(글리세린지방산에스테르혼합제)				
		<b>100.0000%</b>	<b>1000.0000</b>	<b>2000.0000</b>
시험군1	원 료 명	배합비율(%)	합량(mg)	1일 총섭취량
	<b>고추씨 추출물</b>	<b>72,5000%</b>	<b>725.0000</b>	<b>1450.0000</b>
	결정셀룰로오스(M101)			
	HPMC(국산-롯데)			
	스테아린산마그네슘(싱가포르산)			
	이산화티타늄(Tio2)			
	카카오색소(JS-200)			
	미바셋-엑상(글리세린지방산에스테르혼합제)			
	<b>100.0000%</b>	<b>1000.0000</b>	<b>2000.0000</b>	
시험군2	원 료 명	배합비율(%)	합량(mg)	1일 총섭취량
	<b>고추씨 추출물</b>	<b>36,0000%</b>	<b>360.0000</b>	<b>720.0000</b>
	<b>파인엑셀</b>	<b>12,5000%</b>	<b>125.0000</b>	<b>250.0000</b>
	덱스트린(DE-17~19,9)			
	결정셀룰로오스(M101)			
	HPMC(국산-롯데)			
	스테아린산마그네슘(싱가포르산)			
	이산화티타늄(Tio2)			
	카카오색소(JS-200)			
	미바셋-엑상(글리세린지방산에스테르혼합제)			
	<b>100.0000%</b>	<b>1000.0000</b>	<b>2000.0000</b>	

③ 1차 배합비로 생산된 시험식품에서 불량 발생

- 인체적용시험 식품 생산 시 제형 검토단계에서 확인하지 못한 미흡점(대조군 대비 강한 매운맛, 대조군과 다른 입자 크기(파인엑셀 추출물: 고운 미분))이 추가로 발견되었으며, 보관 시 시험식품의 흡습에 의한 정제의 파손이 보고되어 인체적용시험 식품의 배합비 재검토가 불가피함에 따라 시험식품 제작 및 인체적용시험의 진행이 전반적으로 지연됨

Table 35. 1차 시험식품 불량(coating cracking)

	
<p>실온 보관 조건에서 정제 옆면에 film coating cracking 현상이 일어나며, 심한 경우 tablet 상층부에 capping이 일어남</p>	<p>실온 보관 조건에서 정상적인 정제 형태를 유지함</p>
<p><b>문제점:</b> 타정 후 실온, 습도 조건에서 장기(3개월 이상) 보관 시 흡습에 의해 film coating cracking, tablet capping 현상이 일어남. 대조군에서는 이러한 현상이 발생하지 않는 것을 보아, 시험군의 시험물질(RPE, RPEC)의 흡습에 의한 현상으로 추측됨. 이에 추가 제형검토 및 인체적용시험용 시험식품의 재생산을 통해 문제해결이 필요함</p>	

④ 인체적용시험용 시험식품 배합비 재검토

- 섭취량의 최소화를 위하여 2정/일로 검토되었던 배합을, 제형검토를 통해 유당 및 덱스트린의 비율을 증가시켜 4정/일로 시험식품 재검토

Table 36. 인체적용시험용 시험식품 배합비 (2차)

	원 료 명	배합비율(%)	합량(mg)	1일 총섭취량
	대조군	유당95	50.0000%	500.0000
덱스트린(DE-17~19,9)		46.5000%	465.0000	1860.0000
HPMC(국산-롯데)				
스테아린산마그네슘(싱가포르산)				
이산화티타늄(TiO2)				
카카오색소(JS-200)				
미바셋-엑상(글리세린지방산에스테르혼합제)				
		<b>100.0000%</b>	<b>1000.0000</b>	<b>4000.0000</b>
	원 료 명	배합비율(%)	합량(mg)	1일 총섭취량
	시험군1	<b>고추씨 추출물</b>	<b>36.2500%</b>	<b>362.5000</b>
유당95				
덱스트린(DE-17~19,9)				
HPMC(국산-롯데)				
스테아린산마그네슘(싱가포르산)				
이산화티타늄(TiO2)				
카카오색소(JS-200)				
미바셋-엑상(글리세린지방산에스테르혼합제)				
	<b>100.0000%</b>	<b>1000.0000</b>	<b>4000.0000</b>	
	원 료 명	배합비율(%)	합량(mg)	1일 총섭취량
	시험군2	<b>고추씨 추출물</b>	<b>18.0000%</b>	<b>180.0000</b>
<b>파인엑슬</b>		<b>6.2500%</b>	<b>62.5000</b>	<b>250.0000</b>
유당95				
덱스트린(DE-17~19,9)				
HPMC(국산-롯데)				
스테아린산마그네슘(싱가포르산)				
이산화티타늄(TiO2)				
카카오색소(JS-200)				
미바셋-엑상(글리세린지방산에스테르혼합제)				
	<b>100.0000%</b>	<b>1000.0000</b>	<b>4000.0000</b>	

나) 인체적용시험용 시험식품 포장 및 라벨작업

- 포장 구성 : 박스(13cm(w)\*10cm(h)\*10.5cm(d)), 간지, 실리카겔, 시험식품(PTP 포장)
- PTP 박막포장 및 흡습 방지를 위한 알루미늄 지퍼백&소포장 실리카겔 추가 제공

: 흡습 및 오염을 방지하기 위하여 각기 PTP plate 포장으로 진행하였으며, 인체적용시험 중 시험 대상자의 시험식품 섭취 과정에서 발생할 수 있는 흡습을 방지하기 위해 알루미늄 소포장백 및 실리카겔을 추가로 제공, 대상자 교육 시 보관에 유의하도록 교육함

Table 37. 인체적용시험 포장

	
<p>시험식품 PTP 포장</p>	<p>박스 앞면</p>
	
<p>알루미늄 지퍼백&amp;실리카겔</p>	<p>박스 포장(+시험식품(PTP 포장))</p>

다) 인체적용시험용 시험식품 안전성 검토

- 인체적용시험용 시험식품인 정제(Tablet)으로 6개월간 안정성을 확인하기로 함. 유해물질 중 잔류농약, 중금속 등은 원물에서 잔류하기 때문에 추출물로 규격을 설정함. 따라서, 정제의 안전성은 1, 3, 6개월에 걸쳐 대장균군, 일반세균의 측정을 품질관리부에 의뢰하여 시험식품의 안전성을 검토함
- 0개월~6개월에 걸쳐 대장균군과 일반세균을 측정된 결과 대장균군은 모두 음성이었으나 일반세균의 경우 결과 값에서 차이가 나타남. 그러나, 10배수(log) 이하의 차이가 나타나며 일반세균의 경우 액상형태의 건강기능식품에만 기준 규격에 정해져있어 규격에 어긋나지는 않음. 정제(Tablet)의 수분활성도는 미생물의 생육에 적합하지 않기 때문에 이와 같은 분석값의 차이는 실험 균질화의 오류 또는 실험 오차로 판단됨

Table 38. 인체적용시험용 시험식품 미생물검사 결과(6개월)

항목	0개월(18.04)	1개월(18.05)	3개월(18.7)	6개월(18.10)
대장균군 (기준 : 음성)	음성	음성	음성	음성
일반세균* (기준 : 없음)	45 cfu/g	0 cfu/g	67 cfu/g	200 cfu/g

\* 액상형태의 건강기능식품만 일반세균 100 cfu/mL의 기준규격을 가지고 있음

(2) IRB 심의 및 인체적용시험의 개시

- IRB 초심의 : 2017. 09. 26 [결과 : 보완]
- IRB 초심의 보완 : 2017. 10. 31 [결과 : 승인]
- 인체적용시험 개시모임 : 2018. 04. 20
- 인체적용시험 배상 책임 보험 가입 : KB손해보험, 2018. 05. 08
- 인체적용시험 개시 : 2018. 05. 10 (첫번째 대상자 등록완료)

Table 39. 인체적용시험 계획 주요 변경사항 (IRB 수정심의)

IRB 심의	항목	변경 전	변경 후	변경 사유
2차 17.12.28	대상자	‘과체중 혹은 비만인 여성 ‘	‘과체중인 여성 ‘	WHO에서 정의한 비만 기준(과체중: BMI 25-30 kg/m <sup>2</sup> )과 식품의약품안전처에서 발간한 건강기능식품 기능성 평가 가이드(체지방 감소에 도움)의 시험대상자 선별기준을 적용하여 대상자의 정의 변경
	제외 기준	-	최근 1개월 이내에 다른 임상시험에 참여하였거나 참여할 계획이 있는 자	제외기준 항목 추가
3차 18.05.14	대상자	‘과체중인 여성 ‘	‘과체중인 성인 ‘	선정기준에 남성 추가 : 대상자 모집을 원활히 하기 위함
4차 18.08.31	대상자	Drop-out(12%)	Drop-out(27%)	본 시험을 통해 기대하는 차이값과 더 근접한 문헌으로 대상자 수를 재산출함
5차 18.10.30	연구 기간	IRB 승인 후 12개월	IRB 승인 후 24개월	목표한 시험대상자 등록이 1년 내에 완료되지 않아 인체적용시험 기간을 연장

## 나. 인체적용시험 진행 및 완료

### (1) 인체적용시험 대상자 등록



Fig 112. NOVA-RPEC 인체적용시험 시험대상자 등록 현황

- First patient In : 2018. 05. 10
- Last patient In : 2018. 11. 09
- Last patient Out : 2019. 01. 30

목표대상자	Screening	Screening Fail	등록자 (%)	중도탈락 (D/O)	완료자
120	126	6	120 (100%)	23	97

Table 40. 인체적용시험대상자 참여상태

	시험군I n(%)	시험군II n(%)	대조군 n(%)	합계 n(%)
무작위 배정	40 (100.00)	40 (100.00)	40 (100.00)	120 (100.00)
중도탈락	3 (20.00)	4 (10.00)	11 (27.50)	23 (19.17)
- 동의절차	3 (7.50)	3 (7.50)	8 (20.00)	14 (11.67)
- 추적실패	4 (10.00)	1 (2.50)	3 (7.50)	8 (6.67)
- 병용금지 약물 복용	1 (2.50)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.83)
시험종료	32 (80.00)	36 (90.00)	29 (72.50)	97 (80.83)

### (2) 연구의 진행 및 광고

- 인체적용시험의 모니터링은 연구기간동안 총 26회 진행되었음 (네오뉴트라)
- 시험용 식품 입고





- 인체적용시험 대상자 D/O가 집중적으로 생길 수 있는 연휴기간(추석기간) 내 시험대상자 이탈을 최소화 하기위한 SNS 문자 발송 (2018. 09. 21, 2019. 09. 25 2차례 발송)

#### 4. 인체적용시험 유효성 및 안전성 평가 결과

- 인체적용시험에 적용되는 분석군의 종류 [PPS : per protocol set, FAS : full analysis set]

Table 41. 인체적용시험 분류에 따른 분석방법

분류		주분석	추가분석
인구학적 평가		PPS	-
유효성 평가		PPS	FAS
보조 유효성 평가	관련 식품 섭취 빈도	PPS	-
	순응도	PPS	FAS
	병용약물	PPS	-
안전성 평가		Safety set	-
기타 평가(영양 평가)		PPS	-

- 시험완료 후 블라인드 해제 미팅을 통해 PPS과 FAS, Safety set의 분석 인원을 조정함  
1차 유효성평가 결과가 없는 D/O 대상자들은 자동으로 분석군에서 제외됨 (Fig 114)
- Safety set : 총 120명
- PP set : 총 94명
- FA set : 총 96명

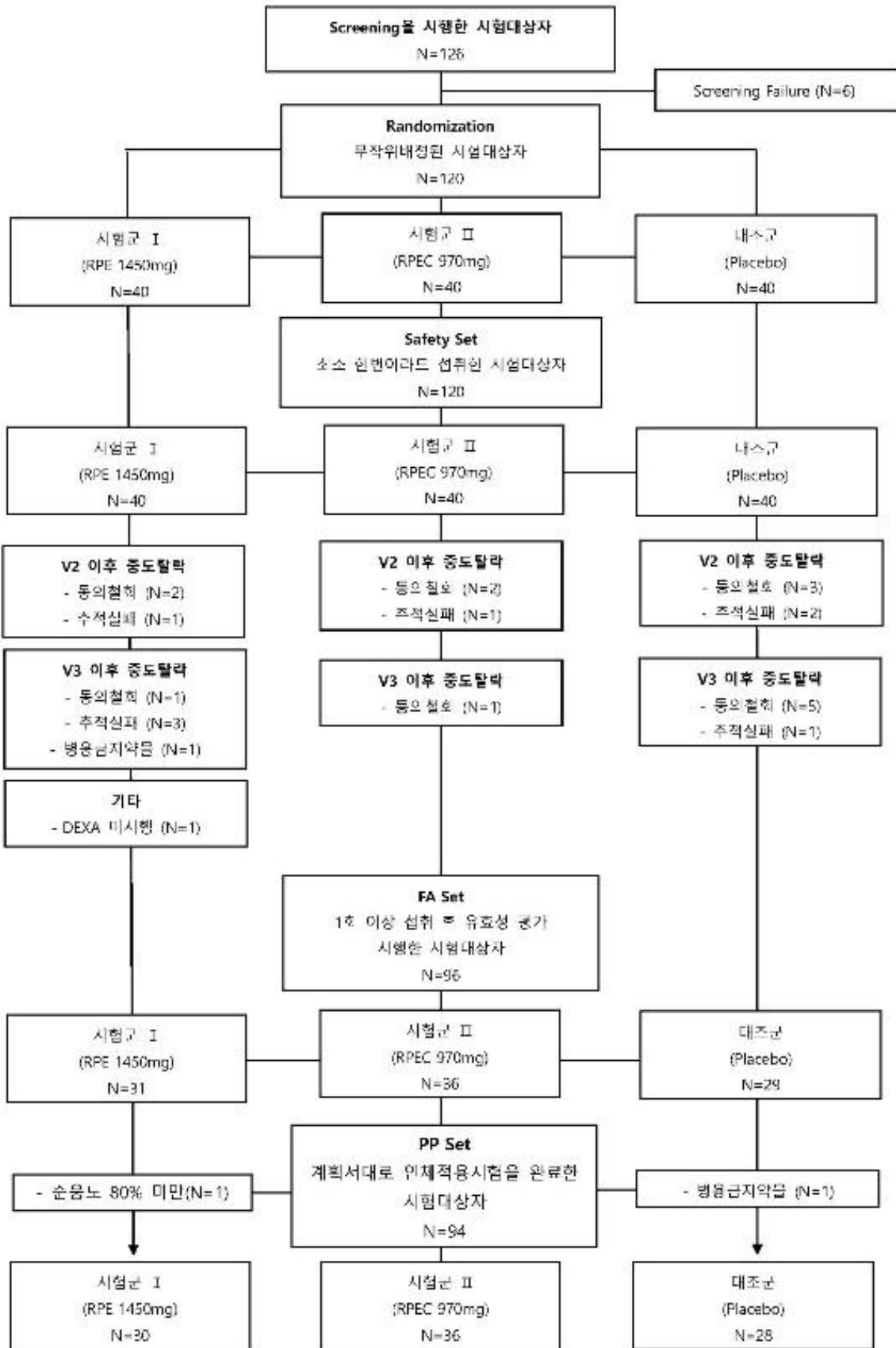


Fig 114. 인체적용시험대상자의 참여상태 및 분석군

### 가. 인체적용시험 체지방 감소 관련 유효성 분석

- 유효성 평가변수에 대한 분석방법으로 평가변수와 연관이 있는 인체적용시험대상자의 기저특성(공변량, 인체적용시험대상자가 인체적용시험용 식품을 복용하기 전에 관찰되거나 측정된 일차 유효성 평가변수에 영향을 미칠 것으로 예상되는 변수)을 고려하여 분석하는 ANCOVA를 실시 할 수 있음
- 유효적 결과의 도출을 위하여 인체적용시험 protocol에서 벗어나지 않는 범위에서 이상반응, 병력, 병용금지약물(특히 비타민, 미네랄, 체지방 감소와 연관될 수 있는 기능식품 포함)을 조사하여 추가 조정을 실시하는 중임. 이 때 대상자의 추가 조정은 반드시 CRO기관 전문가와 담당연구자(의사)의 조언을 받아 진행할 예정
- 1차 유효성 평가를 시행하지 않고 중도탈락한 23명을 제외하여 96명이 FA set 분석 결정
- 시험을 완료한 96명의 대상자(FAS 분석) 중에 순응도가 낮거나(1명), 치아를 발치함으로써 식이를 고르게 섭취하지 못한 대상자(1명), 총 2명을 제외하여 94명의 시험자를 대상으로 PP set 분석을 진행함
- 시험식품의 섭취 순응도는 모든군에서 평균 95% 이상으로 시험대상자들의 참여도가 높았다고 판단됨

Table 42. 시험식품 섭취 순응도 (PP set)

	시험군I N=30		시험군II N=36		대조군 N=28	
	n	Mean±SD	n	Mean±SD	n	Mean±SD
6주 (방문3)	30	98.20±3.79	36	95.70±7.63	28	97.14±3.62
p-value*		0.2828		0.3216		
12주 (방문4)	30	96.27±6.13	36	96.57±4.97	28	97.61±4.20
p-value*		0.3414		0.3780		
Total	30	97.24±3.34	36	96.13±4.35	28	97.38±2.07
p-value*		0.8492		0.1375		

#### (1) DEXA를 통한 체지방률 변화량

- 체지방 감소 기능성의 1차 유효성 평가 마커인 DEXA scan을 통해 체내 체지방률의 변화량을 분석한 결과, 기저치(0주차) 대비 섭취 후(12주차) 체지방률이 모든 군에서 감소하는 경향(대조군  $-0.80 \pm 2.15$ , 시험군1  $-0.70 \pm 1.54$ , 시험군2  $-0.52 \pm 1.99$ )을 보였으나, 시험군1(고추씨추출물)에서만 섭취 전후 대비 유의적인 체지방률의 감소가 나타남( $p < 0.05$ )
- 그러나 모든 군에서 섭취 후 체지방률 변화량의 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음 (Table 43)

Table 43. DEXA를 통한 체지방률 변화량(PP set)

		시험군I		시험군II		대조군	
		N=30		N=36		N=28	
		n	Mean±SD	n	Mean±SD	n	Mean±SD
	Baseline (방문2)	30	38.09±6.55	36	38.79±6.27	28	39.83±5.77
	p-value <sup>1%</sup>		0.2896 <sup>*</sup>		0.7249 <sup>5%</sup>		
DEXA-	12주 (방문4)	30	37.39±6.78	36	38.27±6.45	28	39.03±6.28
체지방률	Change from baseline	30	-0.70±1.54	36	-0.52±1.99	28	-0.80±2.15
(%)	p-value <sup>1%</sup>		0.0195		0.1256		0.0583
	p-value <sup>5%</sup>		0.8277 <sup>*</sup>		0.7147 <sup>5%</sup>		
	p-value <sup>5</sup>		0.7937		0.5951		

(2) 체중 변화량

- 섭취 6주후 체중의 변화량은 대조군  $-1.24 \pm 1.49$ , 시험군1  $-1.39 \pm 1.67$ , 시험군2  $-1.21 \pm 1.61$ 로 모든 군에서 감소하는 경향을 보임. 섭취 12주후 체중의 변화량은 대조군  $-1.70 \pm 2.64$ , 시험군1  $-1.72 \pm 2.52$ , 시험군2  $-1.34 \pm 2.26$  으로 시험군 1,2군에서 대조군에 비해 체중이 더 많이 감소하였으나 시험자간의 variation이 커 군 간 통계적 유의차는 나타나지 않음
- 섭취 전후대비 6주, 12주 후의 모든 군에서 체중이 유의적으로 감소( $p < 0.01$ )하였으나 섭취 구간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음 (Table 44)

Table 44. 체중 변화량 (PP set)

	시험군I		시험군II		대조군		
	N=30		N=36		N=28		
	n	Mean±SD	n	Mean±SD	n	Mean±SD	
체중 (kg)	Baseline (방문1)	30	73.01±8.65	36	72.70±8.47	28	73.50±8.51
	p-value <sup>*%</sup>		0.6022%		0.4732%		
	6주 (방문3)	30	71.62±8.81	36	71.50±8.60	28	72.27±8.33
	Change from baseline	30	-1.39±1.67	36	-1.21±1.61	28	-1.24±1.49
	p-value <sup>**</sup>		<.0001		<.0001		0.0002
	p-value <sup>*%</sup>		0.7121 <sup>†</sup>		0.9030%		
	p-value <sup>‡</sup>		0.6983		0.9681		
	12주 (방문4)	30	71.30±8.81	36	70.98±8.60	28	72.16±8.65
	Change from baseline	30	-1.70±2.64	36	-1.72±2.52	28	-1.34±2.26
	p-value <sup>**</sup>		0.0014		0.0002		0.0040
	p-value <sup>*%</sup>		0.5491 <sup>%</sup>		0.4484 <sup>%</sup>		
	p-value <sup>‡</sup>		0.5702		0.5184		

(3) 허리/엉덩이 둘레비 변화량

- 섭취 6주 후 허리/엉덩이 둘레비의 변화량은 대조군  $-0.01 \pm 0.03$ , 시험군1  $-0.02 \pm 0.03$ , 시험군2  $-0.01 \pm 0.02$ 이며 시험군2의 경우 ANCOVA 분석 시 대조군 대비 통계적인 유의차가 나타남( $p < 0.05$ ). 섭취 12주 후 허리/엉덩이 둘레비의 변화량은 대조군  $-0.03 \pm 0.04$ , 시험군1  $-0.02 \pm 0.03$ , 시험군2  $-0.02 \pm 0.03$ 로 모든 군에서 감소하였으나 군간 통계적 유의차는 나타나지 않음 (Table 45)

Table 45. 허리/엉덩이 둘레비 변화량 (PP set)

	Baseline (방문2)	30	0.92±0.06	36	0.90±0.05	28	0.93±0.06
	p-value <sup>*%</sup>		0.4693 <sup>*</sup>		0.0516 <sup>*</sup>		
	6주 (방문3)	30	0.90±0.06	36	0.89±0.04	28	0.92±0.06
허리/엉덩이 둘레비	Change from baseline	30	-0.02±0.03	36	-0.01±0.02	28	-0.01±0.03
	p-value <sup>**</sup>		0.0058		0.0041		0.1384
	p-value <sup>*%</sup>		0.1832 <sup>*</sup>		0.3883 <sup>*</sup>		
	p-value <sup>§</sup>		0.0998		0.0425		
	12주 (방문4)	30	0.90±0.06	36	0.88±0.05	28	0.91±0.05
	Change from baseline	30	-0.02±0.03	36	-0.02±0.03	28	-0.03±0.04
	p-value <sup>**</sup>		0.0006		0.0002		0.0037
	p-value <sup>*%</sup>		0.8287 <sup>*</sup>		0.5095 <sup>*</sup>		
	p-value <sup>§</sup>		0.9223		0.9131		

#### (4) 체질량 지수(BMI) 변화량

- 모든 군에서 섭취 전후대비 유의적으로 BMI가 감소하였지만 각 군간의 유의적인 차이는 나타나지 않음. 12주 섭취 후 BMI가 대조군  $-0.50 \pm 0.80$ , 시험군1  $-0.63 \pm 0.91$ , 시험군2  $-0.64 \pm 0.92$  감소함

Table 46. 체질량 지수(BMI) 변화량 (PP set)

		시험군I		시험군II		대조군	
		N=30		N=36		N=28	
		n	Mean±SD	n	Mean±SD	n	Mean±SD
체질량지수 (BMI, kg/m <sup>2</sup> )	Baseline (방문1)	30	27.13±1.43	36	27.16±1.40	28	27.30±1.58
	p-value <sup>*%</sup>		0.7030%		0.6897%		
	6주 (방문3)	30	26.60±1.51	36	26.71±1.56	28	26.85±1.61
	Change from baseline	30	-0.52±0.57	36	-0.45±0.60	28	-0.46±0.53
	p-value <sup>**</sup>		<.0001		<.0001		<.0001
	p-value <sup>*%</sup>		0.6410 <sup>*</sup>		0.8657%		
	p-value <sup>§</sup>		0.6160		0.9826		
	12주 (방문4)	30	26.49±1.64	36	26.52±1.63	28	26.80±1.71
	Change from baseline	30	-0.63±0.91	36	-0.64±0.92	28	-0.50±0.80
	p-value <sup>**</sup>		0.0007		0.0002		0.0026
	p-value <sup>*%</sup>		0.5184%		0.4774%		
	p-value <sup>§</sup>		0.5444		0.5159		



(5) 체지방량 및 체지방량 변화량

- 모든 군에서 섭취 전후 체지방량이 유의적으로 감소하였으나 각 군간의 유의적 차이는 나타나지 않음. 체중 중 체지방을 제외한 체지방량을 DEXA로 측정하였을 때 모든 군에서 섭취 전후 체지방량이 감소하는 경향을 보임. 대조군과 시험군2의 체지방량은 기저치 대비 유의적으로 감소하였으나 시험군1의 체지방량은 상대적으로 적게 감소하였으며 유의적인 차이가 나타나지 않음. 따라서, 시험군1은 섭취 전후 체지방량은 유의적으로 감소하였으나 체지방량은 유의적으로 감소하지 않음

Table 47. 체지방량 및 체지방량 변화량 (PP set)

		시험군I		시험군II		대조군	
		N=30		N=36		N=28	
		n	Mean±SD	n	Mean±SD	n	Mean±SD
DEXA- 체지방량	Baseline (방문2)	30	26516.43±4134.54	36	26953.22±3736.21	28	27983.64±3542.04
	p-value <sup>***</sup>		0.1536 <sup>*</sup>		0.2760 <sup>ns</sup>		
	12주 (방문4)	30	25377.87±4602.81	36	25820.83±3815.02	28	25899.21±4297.33
	Change from baseline	30	-1138.57±1634.53	36	-1132.39±1997.57	28	-1084.43±2110.49
	(g) p-value <sup>**</sup>		0.0007		0.0017		0.0116
	p-value <sup>***</sup>		0.9133 <sup>*</sup>		0.9568 <sup>ns</sup>		
	p-value <sup>§</sup>		0.9748		0.8526		
DEXA- 체지방량	Baseline (방문2)	30	43456.33±9350.88	36	43277.72±8692.39	28	42940.82±8241.12
	p-value <sup>***</sup>		0.7146 <sup>ns</sup>		0.9192 <sup>ns</sup>		
	12주 (방문4)	30	43020.83±8496.41	36	42332.44±8714.90	28	42439.46±8081.90
	Change from baseline	30	-435.50±1885.06	36	-945.28±1093.23	28	-501.36±1215.70
	(g) p-value <sup>**</sup>		0.2158		<.0001		0.0380
	p-value <sup>***</sup>		0.8825 <sup>ns</sup>		0.1300 <sup>*</sup>		
	p-value <sup>§</sup>		0.7874		0.1353		

(6) CT를 통한 내장지방, 피하지방, 총 복부지방 면적 변화량

- 모든 군에서 섭취 전후 대비 내장지방 면적, 피하지방 면적, 총 복부지방 면적이 유의적으로 감소하였으나, 각 군간에 통계적인 유의차는 나타나지 않음



Table 48. 내장지방, 피하지방, 총 복부지방 면적 변화량 (PP set)

		시험군I		시험군II		대조군	
		N=30		N=36		N=28	
		n	Mean±SD	n	Mean±SD	n	Mean±SD
내장지방 면적(cm <sup>2</sup> )	Baseline (방문2)	30	132.62±33.34	36	143.45±44.60	28	144.97±47.55
	p-value*%		0.2544*		0.8963*		
	12주 (방문4)	30	117.57±40.12	36	127.57±42.19	28	125.06±37.97
	Change from baseline	30	-15.05±30.45	36	-15.88±41.03	28	-19.91±34.00
	p-value**		0.0113		0.0261		0.0045
	p-value*%		0.5685*		0.9407%		
	p-value <sup>§</sup>		0.9486		0.6817		
피하지방 면적(cm <sup>2</sup> )	Baseline (방문2)	30	248.02±56.63	36	248.54±44.70	28	266.59±58.00
	p-value*%		0.2227*		0.1647*		
	12주 (방문4)	30	231.95±52.52	36	229.38±49.22	28	251.87±59.81
	Change from baseline	30	-16.07±32.22	36	-19.16±35.79	28	-14.71±35.57
	p-value**		0.0106		0.0028		0.0375
	p-value*%		0.6574%		0.7300%		
	p-value <sup>§</sup>		0.5652		0.3886		
총 복부지 방 면적 (cm <sup>2</sup> )	Baseline (방문2)	30	381.72±60.47	36	394.57±60.58	28	411.76±72.42
	p-value*%		0.0911*		0.3054*		
	12주 (방문4)	30	349.51±72.26	36	359.74±52.39	28	375.18±65.75
	Change from baseline	30	-32.21±37.84	36	-34.83±32.32	28	-36.58±36.09
	p-value**		<.0001		<.0001		<.0001
	p-value*%		0.6548*		0.8395*		
	p-value <sup>§</sup>		0.9228		0.7609		

(7) 혈중 지질(총콜레스테롤, HDL, LDL, 중성지방) 변화량

- 섭취 전후 대비로, 대조군과 시험군1은 총콜레스테롤, LDL, 중성지방이 감소하는 경향을 보이나 유의적인 차이는 나타나지 않음. 특히, 시험군2의 경우 총콜레스테롤과 LDL이 기저치 대비 오히려 증가하였으며 중성지방의 감소폭도 좁았음

Table 49. 혈중 지질(총콜레스테롤, HDL, LDL, 중성지방) 변화량 (PP set)

		시험군I		시험군II		대조군	
		n	Mean±SD	n	Mean±SD	n	Mean±SD
Total Cholesterol (mg/dl)	Baseline (방문1)	30	196.97±29.83	36	207.75±32.72	28	200.79±31.62
	p-value <sup>***</sup>		0.6378 <sup>*</sup>		0.3946 <sup>*</sup>		
	6주 (방문3)	30	196.57±34.30	36	209.94±34.26	28	196.02±31.97
	Change from baseline	30	-0.40±21.36	36	2.19±24.91	28	-3.96±21.67
	p-value <sup>**</sup>		0.9190		0.6005		0.3416
	p-value <sup>***</sup>		0.5309 <sup>*</sup>		0.3035 <sup>*</sup>		
	p-value <sup>†</sup>		0.5980		0.1769		
	12주 (방문4)	30	192.63±31.53	36	213.06±36.26	28	200.29±44.67
	Change from baseline	30	-4.33±21.24	36	5.31±33.73	28	-0.50±29.37
	p-value <sup>**</sup>		0.2729		0.3518		0.9289
p-value <sup>***</sup>		0.8518 <sup>ns</sup>		0.4815 <sup>ns</sup>			
p-value <sup>†</sup>		0.5493		0.3626			
HDL- Cholesterol (mg/dl)	Baseline (방문1)	30	56.73±9.75	36	55.19±11.22	28	55.36±12.26
	p-value <sup>***</sup>		0.6628 <sup>ns</sup>		0.9561 <sup>*</sup>		
	6주 (방문3)	30	56.67±10.46	36	54.31±9.42	28	53.64±11.21
	Change from baseline	30	-0.07±7.24	36	-0.89±6.84	28	-1.71±7.00
	p-value <sup>**</sup>		0.9601		0.4405		0.2058
	p-value <sup>***</sup>		0.3825 <sup>*</sup>		0.6370 <sup>*</sup>		
	p-value <sup>†</sup>		0.2735		0.6123		
	12주 (방문4)	30	56.77±11.57	36	55.83±10.89	28	55.71±10.43
	Change from baseline	30	0.03±9.17	36	0.64±8.76	28	0.36±7.00
	p-value <sup>**</sup>		0.9843		0.6644		0.7916
p-value <sup>***</sup>		0.6126 <sup>ns</sup>		0.5509 <sup>ns</sup>			
p-value <sup>†</sup>		0.9772		0.8999			
LDL- Cholesterol (mg/dl)	Baseline (방문1)	30	115.77±20.12	36	127.39±24.65	28	120.62±26.29
	p-value <sup>***</sup>		0.4125 <sup>*</sup>		0.3084 <sup>*</sup>		
	6주 (방문3)	30	116.93±23.01	36	129.72±25.04	28	116.68±23.70
	Change from baseline	30	1.17±14.49	36	2.33±18.00	28	-2.14±15.95
	p-value <sup>**</sup>		0.6625		0.4418		0.4833
	p-value <sup>***</sup>		0.4112 <sup>*</sup>		0.3039 <sup>*</sup>		
	p-value <sup>†</sup>		0.5499		0.1299		
	12주 (방문4)	30	111.93±24.25	36	130.69±24.28	28	119.75±32.93
	Change from baseline	30	-3.83±17.22	36	3.31±24.03	28	-1.07±22.13
	p-value <sup>**</sup>		0.2327		0.4148		0.7997
p-value <sup>***</sup>		0.9689 <sup>ns</sup>		0.4086 <sup>ns</sup>			
p-value <sup>†</sup>		0.5369		0.2675			
Triglyceride (mg/dl)	Baseline (방문1)	30	132.20±68.38	36	129.17±48.25	28	136.57±87.79
	p-value <sup>***</sup>		0.7438 <sup>ns</sup>		0.5743 <sup>ns</sup>		
	6주 (방문3)	30	117.53±57.18	36	125.78±48.96	28	115.68±70.67
	Change from baseline	30	-14.67±60.13	36	-3.39±47.94	28	-20.89±68.06
	p-value <sup>**</sup>		0.1919		0.6740		0.1159
	p-value <sup>***</sup>		0.7204 <sup>ns</sup>		0.0868 <sup>ns</sup>		
	p-value <sup>†</sup>		0.7650		0.2516		
	12주 (방문4)	30	109.83±44.53	36	126.19±47.63	28	103.61±58.94
	Change from baseline	30	-22.37±58.57	36	-2.97±53.60	28	-32.96±64.33
	p-value <sup>**</sup>		0.0453		0.7413		0.0115
p-value <sup>***</sup>		0.7794 <sup>ns</sup>		0.0416 <sup>ns</sup>			
p-value <sup>†</sup>		0.4600		0.0241			

(8) 지질 대사 관련 바이오마커(Adiponectin, Leptin) 변화량

- 섭취 6주후 Adiponectin은 대조군과 시험군1에서 각각  $-0.03 \pm 1.13$ ,  $-0.12 \pm 1.81$ 씩 감소하였으나 시험군2에서만  $0.51 \pm 1.59$ 만큼 증가함. 섭취 전후(12주) 대비로, 모든 군에서 Adiponectin이 증가하는 경향이 나타났으나 통계적으로 유의적인 차이는 나타나지 않음. Leptin의 경우 섭취 6주차에서는 시험군2에서만 기저치 대비 유의적으로 Leptin이  $-9.43 \pm 19.52$ 만큼 감소하였으며( $p < 0.01$ ), 12주차에서는 모든 군에서 Leptin이 기저치 대비 유의적으로 감소함( $p < 0.05$ )

Table 50. Adiponectin, Leptin 변화량 (PP set)

		시험군I		시험군II		대조군	
		n	Mean±SD	n	Mean±SD	n	Mean±SD
Adiponectin ( $\mu\text{g/mL}$ )	Baseline (방문1)	30	6.71±2.54	36	6.54±2.85	28	6.01±2.84
	p-value <sup>*%</sup>		0.3262*		0.5930%		
	6주 (방문3)	30	6.59±3.03	36	7.05±3.08	28	5.98±2.58
	Change from baseline	30	-0.12±1.81	36	0.51±1.59	28	-0.03±1.13
	p-value <sup>**</sup>		0.7208		0.0612		0.9002
	p-value <sup>*%</sup>		0.2278%		0.3469%		
	p-value <sup>§</sup>		0.9697		0.0922		
	12주 (방문4)	30	7.35±3.64	36	7.49±4.37	28	6.49±3.36
	Change from baseline	30	0.64±2.69	36	0.95±3.68	28	0.48±1.57
	p-value <sup>**</sup>		0.2026		0.1296		0.1170
	p-value <sup>*%</sup>		0.6351%		0.9568%		
	p-value <sup>§</sup>		0.7962		0.5036		
Leptin (ng/mL)	Baseline (방문1)	30	32.72±17.92	36	33.31±21.30	28	35.45±21.13
	p-value <sup>*%</sup>		0.7675%		0.5883%		
	6주 (방문3)	30	29.99±23.17	36	23.87±15.66	28	31.18±21.83
	Change from baseline	30	-2.73±14.02	36	-9.43±19.52	28	-4.28±22.00
	p-value <sup>**</sup>		0.2951		0.0064		0.3131
	p-value <sup>*%</sup>		0.8215%		0.2363%		
	p-value <sup>§</sup>		0.8648		0.1294		
	12주 (방문4)	30	24.96±18.69	36	24.08±18.66	28	27.01±21.21
	Change from baseline	30	-7.76±14.72	36	-9.23±20.60	28	-8.44±21.28
	p-value <sup>**</sup>		0.0072		0.0110		0.0453
	p-value <sup>*%</sup>		0.7321%		0.7148%		
	p-value <sup>§</sup>		0.9179		0.6576		

## 나. 인체적용시험 안전성 관련 분석

- Safety Set 분석을 주분석으로 시행하였으며, 인체적용시험에 무작위배정된 후 인체적용 시험용 식품을 한번 이상 섭취한 대상자로 시험군I 40명, 시험군II 40명, 대조군 40명이 분석에 포함되며, 인체적용시험용 시험식품 섭취와 관련한 인체 내 안전성 분석은 크게 이상반응, 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사), 활력징후(혈압, 맥박) 총 3가지로 나누어 진행함

### (1) 이상반응 분석

- 모든 군에서 이상반응에 대한 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았으며 중대한 이상반응은 발생하지 않음. 인체적용시험 기간 중 이상반응으로 인한 중도탈락은 없음
- 시험군I : 총 8명의 대상자에서 11건(경도 10건, 중등도 1건)의 이상반응 발생  
시험군II : 총 3명의 대상자에서 7건(경도 5건, 중등도 2건)의 이상반응 발생  
대조군 : 총 2명의 대상자에서 5건(경도 5건)의 이상반응 발생
- 13명(10.8%)에서 이상반응이 나타났으며 총 20건의 경미한 증상, 3건의 중등도 증상이 발견됨. 시험식품과 연관성이 있을 수 있는 이상반응은 위장계 3건, 신경계통(두통, 졸림) 2건으로 아래와 같음. 설사(1건, 시험군1), 잦은 배변(1건, 시험군1), 위장장애(1건, 시험군2), 두통(1건, 대조군), 졸림(1건, 대조군). 시험군에서 경미하지만 위장장애가 나타났으므로 주의사항에 해당 사항을 표기하기로 함

Table 51. 인체적용시험 이상반응 분석

	시험군 I		시험군 II		대조군		합계		P-value*
	N=40		N=40		N=40		N=40		
	례 수	발생율 (%)	례 수	발생율 (%)	례 수	발생율 (%)	례 수	발생율 (%)	
<b>증상정도</b>									
경도 (Mild)	10	90.91	5	71.43	5	100.00	20	86.96	0.4099
중등도 (Moderate)	1	9.09	2	28.57	0	0.00	3	13.04	
중증 (Severe)	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
<b>인체적용 시험용 식품과의 관련성</b>									
명확히 관련 있음	1	9.09	0	0.00	0	0.00	1	4.35	0.7035
관련 있다고 생각됨	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	
관련 있을 가능성 있음	1	9.09	1	14.29	2	40.00	4	17.39	
관련이 없다고 생각됨	1	9.09	2	28.57	0	0.00	3	13.04	
명확히 관련이 없음	8	72.73	4	57.14	3	60.00	15	65.22	
불명	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00	

### (2) 임상병리검사(혈액학적검사/혈액화학적검사, 뇨검사)

- 방문1(0주차)와 방문4(12주차)에 혈액학적검사(WBC, RBC, Hb, Hct, Platelet, Neutrophil, Monocyte, Eosinophil, Basophil, MCV), 혈액화학적검사(Total protein, Albumin, Glucose,

T.Bilirubin, AST(GOT), ALT(GPT), ALP,  $\gamma$ -GTP, BUN, Creatinine, Uric acid, Na, K, Cl, Ca, P), 뇨검사(S.G, pH, Nitrite, Protein, Glucose, Bilirubin, Urobilinogen, Ketone, WBC(L eukocyte), RBC(Erythrocyte)) 분석을 진행함

- 혈중 Platelet, Total protein, ALP, Uric acid, Ca는 섭취 12주 후 시험군I과 대조군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났으나 모두 정상적인 범위 이내의 변화였으며, 이 외 혈액학적 검사 항목 및 혈액화학적검사 및 뇨검사 항목에서는 섭취 12주 후 시험군(I, II)과 대조군 간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음

### (3) 활력징후(혈압, 맥박)

- 이완기혈압 변화량 분석에서 섭취 12주 후 시험군I에서  $0.03 \pm 6.35$  mmHg 증가하였고, 시험군II에서  $2.19 \pm 5.90$  mmHg 증가, 대조군에서  $3.59 \pm 5.90$  mmHg 감소하였으며 시험군(I, II)과 대조군간 통계적으로 유의한 차이가 나타남. 맥박, 수축기혈압에서는 섭취 12주 후 시험군(I, II)과 대조군 간 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않음

## 다. 인체적용시험 결과 요약

제목	과체중인 성인에서 체중 및 체지방 감소에 미치는 RPE 및 RPEC의 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험		
연구목적	고추씨추출물 및 고추씨추출물등 복합물의 체지방 감소 효과 및 안전성을 평가하고자 함		
연구유형	인체시험	IRB 구성 및 승인	N
실험설계	Double-blind	Randomized	Parallel
대상자특징	대상자선정(제외)기준	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 선정기준 : 만 20세 ~65세의 BMI 25~30 미만인 성인 남녀</li> <li>- 제외기준 : 6개월 이내 뇌혈관 질환, 심장질환이 있는 자, 1개월 이내 체중에 영향을 미치는 제품을 복용한 자, 조절되지 않는 고혈압 환자(혈압 160/100 mmHg 이상), 공복 혈당 126 mg/dl 이상 또는 무작위 혈당 200 mg/dl 이상인 자 또는 혈당강하제, 인슐린을 복용하는 당뇨병 환자, 건강지표(TSH, Creatinine, AST, ALT)가 시험기관 정상치를 크게 벗어나는 자, 심한 위장관 증상자, 병력 조사 결과 기준에 부적합한 자, 근골격계 질환으로 운동이 불가능한 자, 고추씨에 민감하거나 알레르기가 있는 자, 3개월 이내 비만프로그램에 참여한 자, 1개월 이내 타임상시험에 참여한 자, 임산부 및 수유부, 기타 사유</li> </ul>	
	특징		
시험물질	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 시험물질1(RPE) : 고추씨추출물 1,450 mg + 유당 1,600 mg + 텍스트린 810 mg + 카카오색소 코팅</li> <li>- 시험물질2(RPEC) : 고추씨추출물등 복합물 970 mg + 유당 1,690 mg + 텍스트린</li> </ul>		

		1,200 mg + 카카오색소 코팅	
		- 대조물질 : 유당 2,000 mg + 덱스트린 1860 mg + 카카오색소 코팅	
시험디자인	대조군	placebo	대조물질 섭취, 1g/정, 1일 2회 2정씩 총 4g/일 섭취
		positive	없음
		negative	없음
	시험군	시험물질1 (RPE) 섭취, 1g/정, 1일 2회 2정씩 총 4g/일 섭취	
		시험물질2 (RPEC) 섭취, 1g/정, 1일 2회 2정씩 총 4g/일 섭취	
디자인	1. 8시간 금식 상태에서 체중, 허리/엉덩이 둘레 측정	섭취량	1g/정, 1일 2회 2정씩 총 4g/일
	2. 복부 CT : 영상 요추 4~5번 위치 기준으로 Hounsfield number -190~-30에 속하는 부위에서 측정 간 CT : 관심영역에서 CT attenuation values를 3회 측정 하여 평균값을 CT attenuation number로 함	섭취기간	12주
식이조절	평상시보다 500 kcal/일 감량 섭취, 매일 300 kcal 이상에 해당하는 운동 실시 고지방, 고탄수화물, 음주 주의 및 고추, 소나무껍질 관련 식품 섭취 주의		
바이오마커	체중, 엉덩이둘레, 허리/엉덩이 둘레비, 체질량지수(BMI), 체지방량, 제지방량 (DEXA), 내장지방 면적, 피하지방 면적, 총 복부지방 면적, 내장/피하지방 면적비 (CT), 혈중 지질(콜레스테롤, HDL, LDL, 중성지방), Adiponectin, Leptin, hs-CRP		
통계처리	SAS 이용 분석, mean+SD, 유의성 p<0.05 ANCOVA, two ample t-test, 카이제곱 또는 피셔 정확검정		
시험결과	<p>-체지방률(DEXA) 변화량 분석 결과, 시험군I에서 섭취 전후 체지방률이 유의적으로 감소하였으나 대조군과 유의한 차이는 나타나지 않음. 체지방량(DEXA) 분석 결과, 섭취 전후 모든 군에서 유의적으로 감소하였으나 대조군과 유의한 차이는 나타나지 않음. 제지방량(DEXA) 변화량 분석 결과, 모든 군에서 제지방량이 감소하는 경향이 나타났으며 시험군II와 대조군은 섭취 전후 제지방량이 유의적으로 감소함. 단, 군간 유의적 차이는 나타나지 않음</p> <p>-체중 및 체질량지수(BMI) 변화량 분석 결과, 섭취 전후 모든 군에서 유의적으로 감소하였으나, 대조군과 유의한 차이는 나타나지 않음</p> <p>-허리둘레, 엉덩이둘레, 허리/엉덩이 둘레비를 확인한 결과, 섭취 전후 모든 군에서 유의적인 감소가 있었으나 대조군과 유의한 차이는 나타나지 않음</p> <p>-CT scan을 통해 내장지방 면적, 피하지방 면적, 복부지방 면적의 변화량을 분석한 결과 모든군에서 섭취 전후 지방 면적이 유의적으로 감소하였으나 군간 유의차는 나타나지 않음</p> <p>-혈중 Platelet, Total protein, ALP, Uric acid, Ca는 섭취 12주 후 시험군I과 대조군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났으나 모두 정상적인 범위 이내의 변화였으며, 이 외 혈액학적 검사 항목 및 혈액화학적검사 및 뇨검사 항목에서는 섭취 12주 후 시험군(I, II)과 대조군 간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음</p>		



	-모든군에서 중대한 이상반응은 발생하지 않았으며 이상반응과 인체적용시험용 식품과의 관련성에서 세 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않음 -결론적으로 시험식품의 섭취는 비교적 안전하며, 고추씨추출물 및 고추씨추출물등 복합물은 섭취 전후 체중, 체지방, 허리/엉덩이 둘레, 내장/피하/복부지방 면적을 유의적으로 감소시켰으나 대조군과 비교하였을 때 통계적 유의성을 나타내지 않음. 특이적으로 시험군I은 유일하게 섭취 전후 체지방률을 유의적으로 감소시켰으나 체지방량은 유의적으로 감소시키지 않아 근육의 손실없이 체지방을 감소시킬 수 있는 원료로 추측됨
비고	통계학적으로 유의한 결과를 도출하기 위해 ANCOVA 등 다각도의 분석 진행 중

## 제 7 절 제형 검토 및 시제품 제작

### 1. 제형 검토

- 후보 제형으로는 연질캡슐, 경질캡슐, 정제, 스틱젤리, 구미젤리, 분말을 고려하였으나 원료가 물 추출물이기에 연질캡슐을 제외하였으며 섭취 편의성이 떨어지는 분말(포), 스틱젤리(포)를 제외한 정제, 경질캡슐, 구미젤리 3가지 형태로 제형을 검토함
- 노바렉스 제제연구부에서 제형을 제작 후 직원(n=10)을 대상으로 선택, 외관, 텍스처, 향미를 포함한 선호도 평가를 실시함

Table 52. 제형별 선호도 평가 설문지

<p style="text-align: center;">&lt; 선호도 평가 설문지 &gt;</p> <p style="text-align: center;">* 앞에 놓여진 시료 3종(A, B, C)을 평가하여 주시기 바랍니다. * 각각의 시료를 평가하기 전에, 먼저 물로 입자성을 확인 후에 평가해주시기 바랍니다. * 각 항목에 대한 채점기준을 토대로 선호도 순서(동점 가능)를 매겨주시기 바랍니다.</p>																									
<p>1. 선택을 뚜렷하게 가지고 있는가? (1위-3위)</p> <table border="1"> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>캡슐</th> <th>구미젤리</th> </tr> <tr> <td>순위</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>이유</td> <td>신변 관리와 복습이 수월하여 좋음</td> <td>맛 좋음</td> <td>색이 예뻐요</td> </tr> </table> <p>* 선택이 뚜렷하며 선호도가 가장 높음 : 1위 * 선택이 뚜렷하지 않으며 선호도가 가장 낮음 : 3위</p>	시료	정제	캡슐	구미젤리	순위	1	2	3	이유	신변 관리와 복습이 수월하여 좋음	맛 좋음	색이 예뻐요	<p style="text-align: center;">&lt; 선호도 평가 설문지 &gt;</p> <p style="text-align: center;">* 앞에 놓여진 시료 3종(A, B, C)을 평가하여 주시기 바랍니다. * 각각의 시료를 평가하기 전에, 먼저 물로 입자성을 확인 후에 평가해주시기 바랍니다. * 각 항목에 대한 채점기준을 토대로 선호도 순서(동점 가능)를 매겨주시기 바랍니다.</p> <p>1. 선택을 뚜렷하게 가지고 있는가? (1위-3위)</p> <table border="1"> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>캡슐</th> <th>구미젤리</th> </tr> <tr> <td>순위</td> <td>2</td> <td>1</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>이유</td> <td>구미젤리는 다량 섭취하기가 부담스러움</td> <td>캡슐 내용물 기장 잘 보임</td> <td>분말 타입이 좋음</td> </tr> </table> <p>* 선택이 뚜렷하며 선호도가 가장 높음 : 1위 * 선택이 뚜렷하지 않으며 선호도가 가장 낮음 : 3위</p>	시료	정제	캡슐	구미젤리	순위	2	1	3	이유	구미젤리는 다량 섭취하기가 부담스러움	캡슐 내용물 기장 잘 보임	분말 타입이 좋음
시료	정제	캡슐	구미젤리																						
순위	1	2	3																						
이유	신변 관리와 복습이 수월하여 좋음	맛 좋음	색이 예뻐요																						
시료	정제	캡슐	구미젤리																						
순위	2	1	3																						
이유	구미젤리는 다량 섭취하기가 부담스러움	캡슐 내용물 기장 잘 보임	분말 타입이 좋음																						
<p>2. 외관을 뚜렷하게 가지고 있으며 고유 특성을 가지고 있는 것은? (1위-3위)</p> <table border="1"> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>캡슐</th> <th>구미젤리</th> </tr> <tr> <td>순위</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>이유</td> <td>선택이 적음</td> <td>선택이 적음</td> <td>색깔이 밝고 맛 좋음</td> </tr> </table> <p>* 입자의 밀도, 촉감 및 텍스처의 선호도가 가장 높음 : 1위 * 입자의 밀도, 촉감 및 텍스처의 선호도가 가장 낮음 : 3위</p>	시료	정제	캡슐	구미젤리	순위	1	2	3	이유	선택이 적음	선택이 적음	색깔이 밝고 맛 좋음	<p>2. 외관을 뚜렷하게 가지고 있으며 고유 특성을 가지고 있는 것은? (1위-3위)</p> <table border="1"> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>캡슐</th> <th>구미젤리</th> </tr> <tr> <td>순위</td> <td>2</td> <td>1</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>이유</td> <td>-</td> <td>-</td> <td>색깔이 밝고 맛 좋음</td> </tr> </table> <p>* 입자의 밀도, 촉감 및 텍스처의 선호도가 가장 높음 : 1위 * 입자의 밀도, 촉감 및 텍스처의 선호도가 가장 낮음 : 3위</p>	시료	정제	캡슐	구미젤리	순위	2	1	3	이유	-	-	색깔이 밝고 맛 좋음
시료	정제	캡슐	구미젤리																						
순위	1	2	3																						
이유	선택이 적음	선택이 적음	색깔이 밝고 맛 좋음																						
시료	정제	캡슐	구미젤리																						
순위	2	1	3																						
이유	-	-	색깔이 밝고 맛 좋음																						
<p>3. 향미를 뚜렷하게 가지고 있으며 이취와 이취가 없는 것은? (1위-3위)</p> <table border="1"> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>캡슐</th> <th>구미젤리</th> </tr> <tr> <td>순위</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>이유</td> <td>없음</td> <td>없음</td> <td>약간 쓴맛이 있음</td> </tr> </table> <p>* 맛과 향의 선호도가 가장 높음 : 1위 * 맛과 향의 선호도가 가장 낮음 : 3위</p>	시료	정제	캡슐	구미젤리	순위	1	2	3	이유	없음	없음	약간 쓴맛이 있음	<p>3. 향미를 뚜렷하게 가지고 있으며 이취와 이취가 없는 것은? (1위-3위)</p> <table border="1"> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>캡슐</th> <th>구미젤리</th> </tr> <tr> <td>순위</td> <td>3</td> <td>1</td> <td>2</td> </tr> <tr> <td>이유</td> <td>향미가 너무 짝딱딱함</td> <td>맛, 향미, 외관 모두 좋음</td> <td>맛은 좋음</td> </tr> </table> <p>* 맛과 향의 선호도가 가장 높음 : 1위 * 맛과 향의 선호도가 가장 낮음 : 3위</p>	시료	정제	캡슐	구미젤리	순위	3	1	2	이유	향미가 너무 짝딱딱함	맛, 향미, 외관 모두 좋음	맛은 좋음
시료	정제	캡슐	구미젤리																						
순위	1	2	3																						
이유	없음	없음	약간 쓴맛이 있음																						
시료	정제	캡슐	구미젤리																						
순위	3	1	2																						
이유	향미가 너무 짝딱딱함	맛, 향미, 외관 모두 좋음	맛은 좋음																						
<p>4. 각 항목의 선호도를 토대로 최종 선호 제품 선정</p> <table border="1"> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>캡슐</th> <th>구미젤리</th> </tr> <tr> <td>선호제품(V)</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>이유</td> <td>상차이 없음</td> <td>상차이 없음</td> <td>개인적인 선호도 차이</td> </tr> </table>	시료	정제	캡슐	구미젤리	선호제품(V)	1	2	3	이유	상차이 없음	상차이 없음	개인적인 선호도 차이	<p>4. 각 항목의 선호도를 토대로 최종 선호 제품 선정</p> <table border="1"> <tr> <th>시료</th> <th>정제</th> <th>캡슐</th> <th>구미젤리</th> </tr> <tr> <td>선호제품(V)</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>3</td> </tr> <tr> <td>이유</td> <td>상차이 없음</td> <td>맛, 향미, 외관 모두 좋음</td> <td>대부분 약간의 향미, 맛에 대한 선호도 차이</td> </tr> </table>	시료	정제	캡슐	구미젤리	선호제품(V)	1	2	3	이유	상차이 없음	맛, 향미, 외관 모두 좋음	대부분 약간의 향미, 맛에 대한 선호도 차이
시료	정제	캡슐	구미젤리																						
선호제품(V)	1	2	3																						
이유	상차이 없음	상차이 없음	개인적인 선호도 차이																						
시료	정제	캡슐	구미젤리																						
선호제품(V)	1	2	3																						
이유	상차이 없음	맛, 향미, 외관 모두 좋음	대부분 약간의 향미, 맛에 대한 선호도 차이																						

- 선호도 평가 결과, 구미젤리의 경우 호불호가 많이 갈렸으며 어린층을 타겟층으로 상정했을 때 매운향이 강해 전반적으로 선호도가 낮게 나옴. 매운향과 맛의 경우 마스킹이 어렵다는 제제연구팀의 의견을 받아 이후 제형검토에서 제외하기로 함. 정제와 캡슐의 선호도는 크게 차이가 나지 않았으나 캡슐의 경우 내용물을 그대로 충전하기 때문에 매운향이 나는 부분이 약점으로 나타남. 정제의 경우 섭취가 가장 용이하며 마스킹이 잘되었으나 1g의 정제 사이즈가 너무 크다는 의견이 있었음. 문제가 되었던 정제의 크기를 보완하기 위해 추가 제형검토를 통해 600 mg 사이즈의 제형을 만들었고 사업화 시 600 mg 정제로 치환할 예정임

제형	정제(1g)	정제(600mg)	캡슐	구미젤리
사진				
용량	1 g (4정)	600 mg (4정)	300 mg (4캡슐)	2.8 g (10개)
검토 사항	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 기존에 2정/일 섭취로 만든 시제품에서 cracking 현상이 일어나 배합 재검토</li> <li>- 총 4정/일 섭취</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 시험식품에서 문제가 되었던 정제의 크기를 보완하기 위해 배합비를 재검토함</li> <li>- 총 4정/일 섭취</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 다른 배합없이 충전되므로 1일 섭취량이 가장 작음</li> <li>- 총 4캡슐/일 섭취</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 구미 1개당 포함할 수 있는 원료의 양이 적어 섭취량이 많음(10개)</li> </ul>
장점	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 물류 및 보관이 용이함</li> <li>- 가장 기본적인 형태</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 물류 및 보관이 용이함</li> <li>- 가장 기본적인 형태</li> <li>- 1 g에 비해 섭취가 용이함</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 캡슐의 크기가 작아 섭취가 용이함</li> <li>- 제형 제작이 용이함</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 식감이 좋으며 쉽게 섭취할 수 있는 제형임</li> </ul>
단점	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 알약이 커서 삼키기 어려움</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 경질 캡슐을 분리해서 먹을 경우 매운맛이 강하게 느껴짐</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 일 섭취량이 너무 많음</li> <li>- 매운맛의 마스킹이 잘 되지 않음</li> </ul>
선호도 순위	1	-	2	3
결론	시험식품 및 시제품 제형	추후 1g 정제를 대체	제형 재검토 필요	제외





### 3. 원료 산업화를 위한 마케팅 활동

#### 1) 이미 과제 시작부터 업계에 소개

- 국내 박람회: Bio Korea, 식품산업대전 박람회 부스 오픈을 통한 소개 진행
- 해외 박람회: 건강기능식품 분야에서는 세계적으로 유명한 Vitafood Geneve(스위스) /SSW(미국)/ CPHI China(중국)에 매년 참관 및 부스 오픈을 통한 원료 소개
- 국내 건강기능식품을 다루는 거의 모든 회사 및 해외 30여개 이상의 업체와 네트워크 되어 있어 지속적으로 원료를 소개해 왔음
- 개별인정형 원료 인정 시, 국내 건강기능식품 판매사 및 네트워크 업체/ 해외 제품 판매업체를 대상으로 판매 진행 예정
- 개별인정형 원료 인정 전에는, 현재까지 진행 된 세포/동물실험 자료를 기반으로 국내는 네트워크 업체 중심 및 건강기능식품 부 원료로 사용 예정임

## 제 8 절 기능성 원료 인정 신청 (개별인정신청)

### 1. 기능성 원료 인정 신청서 작성을 위한 자료 수집

- 국내외 인정·허가 현황 및 국내외 사용 현황 자료 수집 및 정리
- 원료의 기준 규격 설정을 위해 성상, 영양성분, 기능성분, 유해물질 등에 대한 식약처 공인분석기관(한국기능식품연구원)의 공인분석을 완료함
- 고추씨추출물등 복합물의 건강기능 ‘식품’으로써의 섭취량과 안전성을 검증하기위해 문헌조사를 통해 섭취근거 정보, 안전성 검색 정보, 섭취량 평가 정보 등의 자료 수집

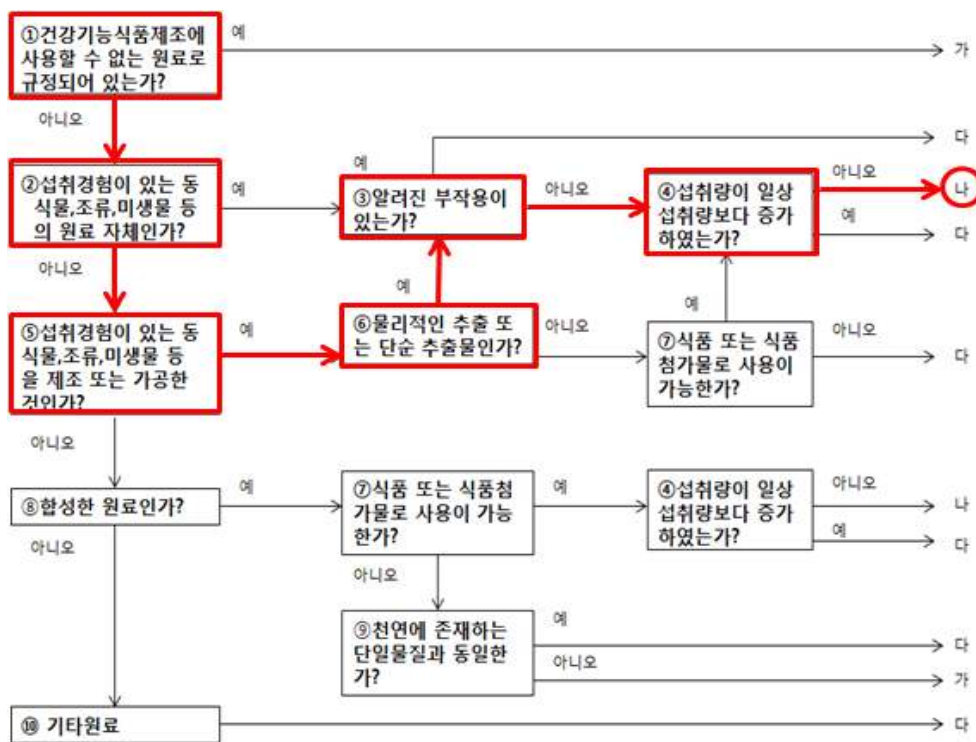


Fig 115. 고추씨추출물등 복합물의 건강기능식품 기능성 원료의 안전성 평가를 위한 의사결정도

## 가. 개별/복합 소재의 섭취량 평가

※ 제시한 일일섭취량 : ‘고추씨추출물등 복합물(신청원료)’ 로써 970 mg/일

- 고추씨추출물(30% 덱스트린 포함) 720 mg + 소나무껍질추출물(파인엑솔) 250 mg

식품군	식품	전체		대도시		중소도시		읍/면지역	
		평균(g)	표준오차(g)	평균(g)	표준오차(g)	평균(g)	표준오차(g)	평균(g)	표준오차(g)
● 채소류									
채소류	고추	4.47	0.27	4.11	0.37	4.01	0.35	7.07	0.88
양념류	고추	22.89	0.63	23.68	1.01	22.22	0.97	22.14	1.4
양념류	고추장	5.49	0.21	5.54	0.31	5.73	0.34	4.61	0.57

(출처 : KHIDI, 국민영양통계)

- 고추의 섭취량은 채소로 섭취하는 고추와 고춧가루 등 양념으로 섭취하는 고추로 나눌 수 있으며, 국내 건 고추 내에서 고추씨의 비율은 25.2~25.8%로 외국산 고추에 비해 고추씨의 함량이 높음

고추(100 kg) → 고추씨(25.5 kg) → 고추씨추출물분말(1.275kg) → 덱스트린 제외(0.89kg)  
50 g/일 500 mg/일

- ‘고추’ 섭취자의 평균 일일섭취량 27.36 g/일, 3배 섭취량 82.08 g/일 (국민영양통계)  
⇒ 원재료(고추)로서 1일에 50 g을 섭취하는 것에 해당하며, 고추장의 섭취량을 제외하더라도 국민 일상섭취량보다 3배이상 증가 하지 않음. 따라서 고추씨추출물 720 mg (덱스트린 제외 시 500 mg)의 섭취량은 적합한 것으로 판단됨
- 소나무껍질추출물(파인엑솔)은 일평균 섭취량이 조사되지 않은 원재료임. 따라서 국내에서 이미 판매되고 있는 해당원료를 포함한 제품과 유사제품의 국내외 섭취량을 비교하여 섭취량의 증감을 확인하고자 함
- 식품 또는 건강기능식품 부원료(유통판매) : 파인엑솔 100 mg/일 섭취
- 유사 제품 : 피크노제놀 60~500 mg/일, 95% OPC 240 mg/일, pine bark 추출물 250 mg/일
- 유사원료 인체적용시험 용량 : 피크노제놀 50~450 mg/일
- 개별인정형원료
  - 1) 소나무껍질추출물 등 복합물(제2008-14호) : 복합물로써 1,130 mg/일
  - 2) 피크노제놀-프랑스해안송겉질추출물(제2006-1호) : 피크노제놀로 50~300 mg/일
- ⇒ 비트젠은 2015년 첫 출시 이후 4년간 유통되었으며 파인엑솔 100 mg/일이 포함된 제품임. 그 외에도 파인엑솔은 피타민씨, 아하핏, 적송보간소 등 다양한 제품으로 판매되며 소나무껍질추출물(파인엑솔) 해당 섭취량은 유통판매 섭취량의 3배를 넘지 않음. 유사원료인 피크노제놀의 개별인정형원료 규격은 항산화 기능성 기준으로 일일 섭취량이 50~300 mg/일 수준이며 다양한 인체적용시험에서 피크노제놀을 50~450 mg/일로 섭취했을 때 안전한 것으로 보고됨. 그 뿐만 아니라 해외의 소나무껍질유래 추출물들의 제품 함량은 제각기 다르나 250 mg/일 이상의 함량을 가진 제품 또한 유통되고 있음. 따라서 소나무껍질추출물(파인엑솔) 250 mg/일의 섭취량은 적합한 것으로 판단됨

## 나. 개별/복합 소재의 안전성 DB 검토

- 고추 및 소나무껍질의 경우 유사원료가 해외에서 식이보충제로 판매되고 있으며 관련 연구가 많이 진행되었음. pubmed 등의 검색엔진을 이용하여 기능과 안전성 관련 정보를 검토함

Table 53. 국내외 DB 검색 목록

검색데이터베이스	검색어	검색결과	안전성 관련 정보 여부
Tox-info	고추 red pepper, <i>Capsicum annuum</i>	X	X
	소나무 red pine	X	X
KISS	<i>Pinus densiflora</i>	X	X
	pine bark	X	X
Toxline, pubmed	[red pepper + adverse or side or toxic], [ <i>Capsicum annuum</i> + adverse or side or toxic]	O	O
	[red pine +adverse or side or toxic], [ <i>Pinus densiflora</i> + adverse or side or toxic], [pine bark + adverse or side or toxic]	O	O
Herbs & Supplements, EBSCO	<i>Capsicum annuum</i>	O	O
	Pine bark extract	O	O
Prescribers' digital reference (PDR)	red pepper, <i>Capsicum annuum</i> ,	X	X
FDA (GRAS)	red pine, pine bark, <i>Pinus densiflora</i> , Icariside E5, Taxifolin,	X	X
FDA poisonous plant DB	Red pepper, <i>Capsicum annuum</i> ,	O	O
	red pine pine bark <i>Pinus densiflora</i>	X	X
American Botanical Council	<i>Capsicum annuum</i>	O	O
	Pycnogenol	O	O
Natural Medicine comprehensive DB	<i>Capsicum</i>	O	O
	Maritime Pine	O	O

- 고추 또는 캡사이신

- : 복부팽만, 가스, 메스꺼움, 구토, 설사 등의 소화불량을 유발할 수 있음
- : 고혈압(170/100mmHg) 사례 2건, 급성 심근경색 사례 2건, 수유 후 영아 피부염 1건, 치아에 나뭇 부식 및 착색이 1건 보고됨
- : IBS 증후군(여성)을 가진 사람과 연관성이 조사됨
- : 위벽 출혈 1건이 보고되었으나 타 논문에서 내시경검사를 통해 위벽에 미치는 영향이 없다는 반박을 함
- : MNNG, DMH로 암을 유도한 쥐 모델에서 발암효과가 나타났으며 한국인의 위암발생률과도 연관이 있다는 논문이 보고되었으나 고추와의 직접적 상관관계가 밝혀지지 않는
- : 천식치료제 theophylline과 병용사용에 주의, 당뇨병 환자, 항혈전제를 먹는 자, 고혈압 환자, 수술을 앞둔 자는 섭취 주의

- 소나무껍질 추출물

- : mild한 위장 장애 어지러움, 두통, 메스꺼움 등의 부작용 보고
- : 가슴통증(심근 경색 병력 환자) 1건, 급성 심부전(관상동맥질환 환자) 1건 보고, 구강궤양, 구취 1건 보고
- : 자가면역질환, 당뇨병 환자, 항혈전제를 먹는 자, 수술을 앞둔 자는 섭취 주의
- : 어린이, 임산부, 수유부의 경우 안전 용량이 설정되어 있지 않아 섭취 주의

- 종합의견

- : 고추의 경우 이상사례가 상당히 많은 편이지만 대체로 고용량의 capsaicin을 섭취한 경우가 많으며 고추와의 정확한 상관관계가 밝혀지지 않은 부작용임. 또한 식품으로 오랜 기간 사용해온 역사가 있으며 고추의 섭취량 평가와 비교했을 때 본 원료의 섭취 수준에서 큰 부작용이 나타나지 않을 것으로 판단됨. 단, 인체적용시험에서도 경미한 위장장애가 나타난 사례가 있으므로 섭취 시 주의사항에 내용을 포함하도록 함
- : 소나무의 경우 해외에서 피크노제놀이라는 이름으로 더 널리 알려져 있으며 미국, EU, 캐나다 등 많은 나라에서 식이보충제로 섭취되고 있는 안전한 원료임

Fig 116. 고추씨추출물등 복합물 개별인정신청서 전체 내용 요약본





## 제 9 절 연구개발 성과

### 1. 논문게재 성과

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일	등록번호
1	적송제제(PineXol®)로부터 Taxifolin과 (+)-catechin, procyanidin B1의 함량분석	생약학회지	황윤정	47(3)	대한민국	생약학회	비SCI (KCI)	16.09.07	
2	고추씨로부터 Icariside E5 와 Vanilloyl Icariside E5의 함량분석	생약학회지	윤성혜	48(2)	대한민국	생약학회	비SCI (KCI)	17.06.12	
3	Down-Regulation of Hepatic de novo Lipogenesis and Adipogenesis in Adipocytes by Pinus densiflora Bark Extract	Journal of Microbiology and Biotechnology	안혜명	27(11)	대한민국	한국미생물·생명공학회	SCI(E)	17.09.05	
4	Red Pepper Seed Inhibits Differentiation of 3T3-L1 Cells during the Early Phase of Adipogenesis via the Activation of AMPK	The American Journal of Chinese Medicine	김화진	46(1)	싱가포르	Institute for Advanced Research in Asian Science and Medicine	SCI(E)	18.01.09	
5	Red Pepper (Capsicum annuum L.) Seed Extract Decreased Hepatic Gluconeogenesis and Increased Muscle Glucose Uptake In Vitro	Journal of medicinal food	김하은	21(7)	미국	Mary Ann Liebert, Inc	SCI(E)	18.07.01	

6	Red pepper seed water extract inhibits preadipocyte differentiation and induces mature adipocyte apoptosis in 3T3-L1 cells	Nutrition Research and Practice	김화진	12(6)	대한민국	한국영양학회	SCI(E)	18.12	
---	--	---------------------------------	-----	-------	------	--------	--------	-------	--

## 2. 국내 및 국제 학술발표 성과

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	Anti-adipogenic effect of red pepper seed water extract through activation of AMPK in 3T3-L1 cells (한국식품과학회)	김현아	2016.08.17	대구 EXCO	대한민국
2	Red pepper seed water extract attenuated lipid accumulation via inducing apoptosis in 3T3-L1 cells (한국식품과학회)	김현아	2016.08.17	대구 EXCO	대한민국
3	Pinus densiflora bark extract(PineXol) decreased body weight and body fat mass by downregulating hepatic lipid synthesis (한국식품과학회)	안혜명	2016.8.17	대구 EXCO	대한민국
4	Quantitative analysis and isolation from the seed of <i>Capsicum annuum</i> L. (생약학회)	윤성혜	2016.11.24	더케이서울 호텔	대한민국
5	Red pepper seed extract suppressed gluconeogenesis in AML 12 and stimulated glucose uptake in C2C12 (Experimental Biology)	김하은	2017.04.23	시카고, McCormick convention center	미국
6	Anti-diabetic effect of compound of pineXol and red pepper seed extract by inhibiting gluconeogenesis in the liver (한국식품과학회)	정정호	2017.06.22	제주 ICC	대한민국
7	Down regulation of hepatic de novo lipogenesis and adipogenesis in adipocytes by pinus densiflora bark extract (한국식품과학회)	정정호	2017.06.22	제주 ICC	대한민국
8	Red pepper seed extract reduced gluconeogenesis in AML 12 and increased glucose uptake in C2C12 (한국식품과학회)	김하은	2017.06.23	제주 ICC	대한민국



9	Red pepper seed water extract inhibits differentiation of 3T3-L1 cells during the early phase of adipogenesis via the activation of AMPK (한국식품과학회)	김현아	2017.06.23	제주 ICC	대한민국
10	Red pepper seed water extract suppresses the HFD-induced obesity in C57BL/6J mice via the AMPK pathway (한국식품과학회)	김현아	2017.06.23	제주 ICC	대한민국
11	Comparisons of anti-adipogenic effect of red pepper seed water extracts prepared at 4° C and 60° C in 3T3-L1 cells (한국식품과학회)	유미경	2018.06.27	부산 BEXCO	대한민국
12	Red pepper seed induced apoptosis was caused by hypophosphorylation of Akt and regulation of Bcl-2 family in 3T3-L1 cells (한국식품과학회)	유미경	2018.06.27	부산 BEXCO	대한민국
13	Co-administration of red pepper seed extract and Korean red pine bark extract reduced fasting glucose by inhibiting hepatic gluconeogenesis (한국영양학회, 젊은 과학자 구두 발표)	정정호	2018.10.19	평창 알펜시아	대한민국
14	Co-administration of red pepper seed extract and Korean red pine bark extract improved glucose homeostasis by suppressing hepatic gluconeogenesis (한국식품영양과학회)	정정호	2018.10.31	부산 BEXCO	대한민국

### 3. 특허성과

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	고추씨추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	(주)노바렉스	2016.09.02	10-2016-0113090	-	-	-	100%
2	고추씨 추출물과 소나무 껍질 추출물을 유효성분으로 포함하는 대사질환의 예방 또는 치료용 조성물	대한민국	국민대학교산학협력단	2017.08.18	10-2017-0104870	국민대학교산학협력단	2018.08.14	10-1890345-0000	100%

3	고추씨 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 및 치료용 조성물	대한민국	(주)노바렉스	2019.06.07	10-2019-0067494	-	-	-	100%
---	---------------------------------------	------	---------	------------	-----------------	---	---	---	------

#### 4. 고용창출 및 전문연구 인력양성

##### - 고용창출

No	고용창출인력명	고용창출일	고용기관	고용형태	분류
1	강주연	2016.05.11	(주)노바렉스	정규직	박사

##### - 전문연구 인력양성

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

#### 5. 전시회 홍보전시

No	행사명칭	날짜	유형	참가품목	국내 외	장소
1	Bio Korea 2018	2018.05.1 1	박람회	고추씨추출물등 복합물 의 개발 중인 원료 다수	국내	COEX
2	THAIFEX-World of Food ASIA	2018.06.0 2	박람회	Rexflavon, 고추씨추출물등 복합물 의 개발 중인 국내 원료 다수	국외	IMPACT Exhibition and convention Center Bangkok, Thailand
3	CPhI China 2018	2018.06.2 2	박람회	Rexflavon, 고추씨추출물등 복합물 의 개발 중인 국내 원료 다수	국외	중국 상해 신국제전람중 심 전시장
4	제남한국우수상 품박람회	2018.07.0 8	박람회	Rexflavon, 고추씨추출물등 복합물 의 개발 중인 국내 원료 다수	국외	중국 제남순경국제 컨벤션센터

5	Vitafoods Asia 2018	2018.09.12	박람회	Rexflavon, 고추씨추출물등 복합물의 개발 중인 국내 원료 다수	국외	Sands Expo & Convention Centre at Marina Bay Sands, Singapore
6	SupplySide West 2018	2018.11.10	박람회	Rexflavon, 고추씨추출물등 복합물의 개발 중인 국내 원료 다수	국외	Mandalay Bay convention center
7	Bio Korea 2019	2019.04.19	박람회	고추씨추출물 등 복합물의 개발중인 원료 다수	국내	COEX

## 6. 기술이전 및 사업화 성과

### - 기술이전 : 직접실시

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 정수현황
1	직접실시	고추씨 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 조성물	(주)노바렉스	2019.04.10	5,656,000원	-

### - 사업화 성과 : 시제품 개발

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	기술보유자의 직접사업화	시제품 개발	국내	체중조절 식품의 개발	체지방 감소 및 체중조절에 효과가 있는 고추씨추출물 등 복합물을 이용한 체중조절 식품의 개발	(주)노바렉스	-	-	-	-

### 제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 제 1 절 연차별 정량적 성과 목표 및 달성도

성과목표	사업화지표									연구기반지표							
	지식 재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
										SCI	비SCI						
최종목표	3	3	1	3			1			4	4	10		1			
1차년도	목표	1								1	1	2					
	실적	1								0	1	3					
2차년도	목표	1					-			1	1	4		1			
	실적	1					1			1	1	7		1			
3차년도	목표	1	-	1	1					2	2	4				-	
	실적	1	1	1	1					3	0	4				7	
소계	목표	3	-	1	1		-			4	4	10		1		-	
	실적	3	1	1	1		1			4	2	14		1		7	
종료 1차년도		1					1										
종료 2차년도				2													
종료 3차년도		1															
종료 4차년도		1															
종료 5차년도																	
소계		3		2			1										
합계		3	3	1	3		1			4	4	10		1		7	

#### 제 2 절 연차별 정성적 성과 목표 및 달성도

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	달성도
1차년도	원료의 표준화	1. 추출공정법 확립 2. 원료의 지표성분 확립 -고추씨 추출물 지표성분 선정 -파인엑셀 지표성분 선정 3. 지표성분 분석법 확립 및 밸리데이션	100%

		-특이성, 정확성, 정량한계, 직선성, 정밀성	
	개별 및 복합물의 항비만 효과 구명	1. cell assay를 통한 항비만 효과 검증 -세포독성 평가 -개별 추출물의 항비만 효과 -복합 추출물의 항비만 효과 2. HFD 동물모델을 통한 항비만 효과 검증 -체중 및 체지방 감소 효과 -식이효율 감소 효과 -인슐린저항성 억제 효과 -지질대사 이상 억제 효과 3. 인체적용시험 dose 결정	100%
	인슐린 저항성 및 지질 생합성 억제 효과 구명	1. 근육세포(C2C12)와 간세포(AML12)에서 개별 및 복합 기능성 소재의 인슐린 내성 개선 효과 검증 2. 간세포(HepG2)에서 파인엑셀 처리에 의한 지질생합성 억제 효과 측정	100%
2차년도	원료의 대량추출	1. 인체적용시험을 위한 Scale-up 수준의 생산공정 기반 확립 2. 인체적용시험용 제형 확보 3. 고추씨 추출물에서 지표물질 선정 및 분석법 확립	100%
	인체적용시험	1. 인체적용시험을 위한 시험법 확립 -CRP 기관 선정 및 시험법 확인 -IRB 통과 및 시험참가자 선정 -시험디자인 2. 인체적용시험 수행	100%
	개별 및 복합 소재의 항비만 기작 구명	1. cell assay를 통한 항비만 기작 구명 -지방세포 분화 및 생성에 관여하는 유전자발현 검증 -에너지 대사 조절에 관여하는 유전자 발현 검증 2. HFD 동물모델을 이용한 항비만 기작 구명 -지질대사 이상 및 인슐린저항성 억제효과 -지방세포 분화 및 지방생성에 관여하는 유전자 발현 검증 -에너지 대사 조절에 관여하는 유전자 발현 검증	100%
	인슐린 저항성으로 비	1. 체중 및 체성분 분석	100%

	만한 동물모델에서 개별 및 복합 소재의 체지방 감소, 인슐린 저항성 개선 효과 구명	2. 간 독성 지표 분석 3. 공복 혈장 혈당, 공복 혈장 인슐린, 혈장 당화혈색소 분석 4. 경구 내당능 분석 5. 간의 포도당신생합성 기전 분석 6. 이상지질혈증 분석 7. 혈중 염증인자 분석	
3차년도	원료의 표준화	1. 산지별 고추씨 구매 및 원료 동등성 확인 2. 시료 반복 대량 추출, 대량생산법 확보	100%
	인체적용시험	1. 인체적용시험 수행 및 모니터링 2. 데이터 정리 및 유효성&안전성 통계 분석	100%
	개별인정등록 신청	1. 기능성원료 인정 신청서 작성 및 접수	100%
	제품화방안 모색	1. 제형검토 2. 시제품 제작 및 품목제조신고 3. 고객사 및 박람회 원료 소개	100%

### 제 3 절 성과 요약

<p>① 정성적 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 개별 및 복합 기능성 소재의 표준화</li> <li>- 개별 및 복합 기능성 소재의 효과 및 작용기전 구명</li> <li>- 인체효능검증을 통한 복합 기능성 소재의 기능성 원료 인정 1건 신청 고추씨추출물등 복합물 970 mg/일, “체지방 감소에 도움을 줄 수 있음”</li> <li>- 일반식품으로 ‘고추먹고 뽀뽀’ 품목제조신고 및 시제품 제작, 해외 박람회에 원료 소개</li> </ul> <p>② 성과 목표</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 지식재산권 : 특허 출원 3건</li> <li>- 기술 실시 : 1건</li> <li>- 사업화 : 제품화 1건</li> <li>- 학술성과 : 논문 8건 (비SCI: 4건, SCI: 4건), 학술 발표 10건</li> <li>- 인력양성 : 1건</li> </ul> <p>③ 가중치</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: center;">세부연구목표</th> <th style="text-align: center;">비중(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">제조공정표준화</td> <td style="text-align: center;">10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">지표물질 확립 및 분석법 확립</td> <td style="text-align: center;">10</td> </tr> </tbody> </table>		세부연구목표	비중(%)	제조공정표준화	10	지표물질 확립 및 분석법 확립	10
세부연구목표	비중(%)						
제조공정표준화	10						
지표물질 확립 및 분석법 확립	10						

고추씨 추출물 및 고추씨/과인엑셀 복합물의 작용기작 구명 및 고지방 식이 동물실험에서의 기능성 확인	20
고추씨 추출물 및 고추씨/과인엑셀 복합물의 작용기작 구명 및 당대사 질환 동물실험에서의 기능성 확인	20
체지방 감소 기능성에 대한 인체적용시험을 통한 효과 확인	30
개별인정형 원료 신청	10
합계	100

④ 달성치

- 지식재산권 : 특허 출원 3건 [목표 3건 대비 100% 달성]  
특허 등록 1건 [목표 외 달성]
- 기술 실시 : 1건 [목표 1건 대비 100% 달성]
- 사업화 : 제품화 1건 [목표 1건 대비 100% 달성]
- 학술성과 : 논문 6건 (비SCI(KCI): 2건, SCI: 4건) [목표 8건 대비 75% 달성]  
학술 발표 14건 [목표 10건 대비 140% 달성]
- 인력양성 : 1건 [목표 1건 대비 100% 달성]
- 홍보전시 : 7건 [목표 외 달성]
- 고용창출 : 1건 [목표 외 달성]
- '체지방감소에 도움을 줄 수 있음' 기능성으로 개별인정신청 접수 1건

## 제 4 절 목표미달성 시 원인 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

① 비SCI 논문 2건 미달성

- 목표대의 실험결과를 토대로 투고한 동물실험 논문에 대해 accept 될 수 있었으나 실험 결과에 비해 저널의 질이 너무 낮아 더 높은 SCI급 저널에 제출하고자 하는 연구자의 의지가 있음. 특히 식품의약품안전처 기준으로 개별인정 신청 시 기반자료로 제출하는 논문은 SCI(E)급 저널만이 가능하므로 장기적으로 기능성 복합소재를 건강기능식품으로 개발하고자 한다면 반드시 SCI(E)급의 저널에 투고해야함. 현재 추가 실험을 통해 데이터를 보완하는 작업 중이며, 2019년 내로 SCI(E)급 저널에 투고하고자 함

② 정성 목표인 기능성원료 인정 신청 및 시제품 제작은 완료하였으므로 이 외에는 해당사항이 없음

# 제 4 장 연구결과의 활용 계획 등

## 제 1 절 연구결과의 차별성 및 시장 경쟁력

- 고추씨추출물등 복합물은 순수 국내 소재(고추씨 : 국내산 홍고추 씨, 파인엑솔 : 국내산 적송 껍질)로 개발된 원료이기 때문에 해외소싱원료가 주인 ‘체지방 감소 기능성원료’ 시장 진입 시 소비자에게 보다 익숙하게 다가갈 수 있는 장점이 있으며 해외에도 많이 알려져 있는 소재이기 때문에 수출&마케팅에도 용이함
- 해외생물자원 이용에 대한 이슈(나고야 의정서)가 있는 시기인 만큼 국내 업체에서도 국내 소재를 바탕으로 건강기능식품 기능성 원료로 개발하고 해외로 진출하고자 하는 시도가 증가함. 그러나, 국내 소재의 경우 가격, 대량 재배, 지속적인 공급 등의 현실적인 문제가 있어 실제로 상용화되는 사례가 많지 않음. 고추씨의 경우 현재까지 사용량이 많지 않으며 고춧가루를 만들 때 제거되는 부위로 농산물 부산물에 해당되어 가격이 저렴함. 또한, 적송껍질의 경우 목재 가공과정에서 탈락되는 임엽 부산물로 사용례가 거의 없어 매년 폐기되고 있는 실정임. 본 소재는 농산/임산의 부산물을 이용하여 원료의 가격경쟁력을 가지며, 추출 공정을 최소화(온도조절 없음, 분무건조)하여 대량생산이 용이하므로 타 원료에 비해 가격 경쟁력이 있음

### 대량생산 및 구매 시 최종 원료가(원가)는 더 낮출 수 있음

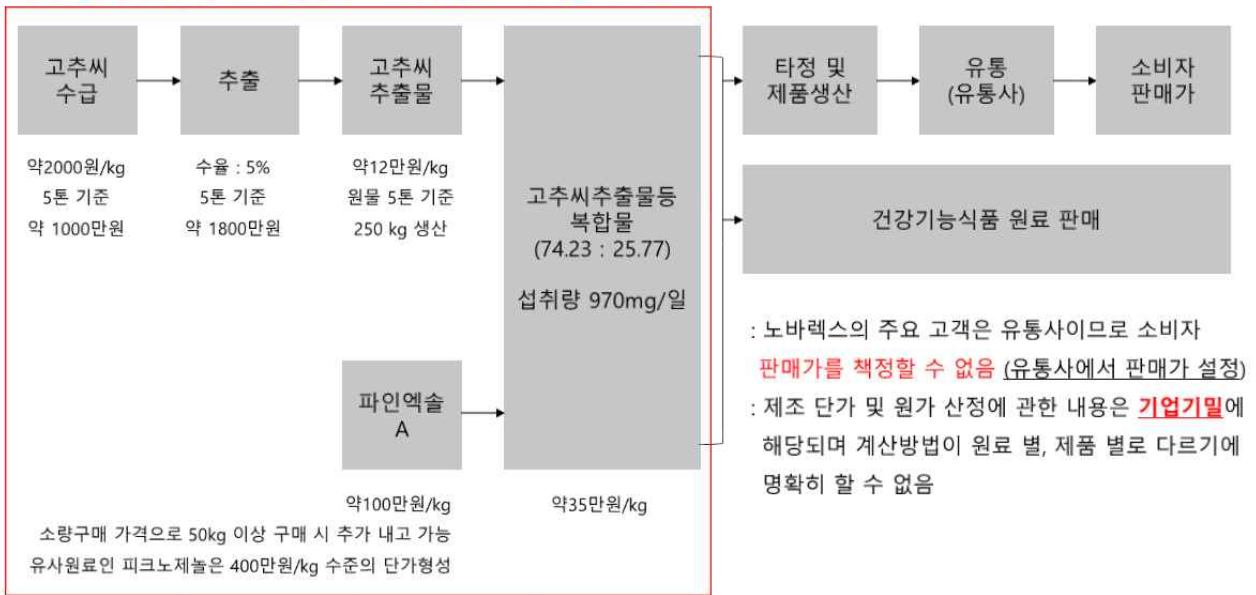


Fig 119. 고추씨추출물등 복합물 350kg 생산 기준 판매원가 로드맵

- 고추씨 원물 1톤 기준으로 생산 가능한 고추씨추출물등 복합물(약 350kg)의 원료 단가는 35만원/kg 수준이나, 이는 복합물 기준으로 1톤 이상 생산 시 30% 이상 원가절감이 가능할 것으로 판단됨 (수 추출, 분무건조이므로 대량 추출 시 비용 감소). 일반적으로 체지방감소 기능성 소재의 경우는 원료기준 톤 단위 이상 판매되기 때문에 상용화시 원가절감이 가능할 것으로 판단됨
- 또한 동물실험을 통해 ‘체지방 감소’와 ‘당대사 개선’ 효과를 모두 확인한 다 기능 소재



로 과잉에너지 섭취에 따라 다양한 대사성질환에 노출되는 현대인들의 삶의 질 향상에 도움을 줄 수 있음

- 노바렉스는 체지방 감소 기능성 개별인정형 원료인 ‘잔티젠’을 독점 판매하고 있음. 그러나 고추씨추출물등 복합물은 물 추출물이므로 기존에 시장을 다져놓은 잔티젠 등의 오일원료/불용성 분말과 시장을 명확히 차별화 할 수 있는 부분이 있음. 따라서 본 원료는 노바렉스의 체지방감소 소재로 기존 시장점유율의 상쇄 없이 양립할 수 있는 소재로 판단됨

Table 54. 체지방 감소 기능성원료와 비교분석

구분	고추씨추출물 등 복합물	돌의잎 주정추출물	가르시니아 캄보지아 추출물	와일드망고 종자추출물	미역 등 복합추출물 (잔티젠)	풋사과추출물 리페놀
사진						
원산지	국내	중국	인도	인도	스페인	중국
원료타입	분말/수용성	분말/불용성	분말/수용성, 불용성	분말/수용성	오일/지용성	분말/불용성
일일 섭취량	970 mg/일	450 mg/일	750~2,800 mg/일 총 (-)-HCA	300 mg/일	600 mg/일	600 mg/일
장점	- 국내산 소재 - 수용성분말 (제형용이) - 다 기능성 - 원료에 대한 국내외 인지도 - 가격경쟁력	- 생소함 - 섭취량	- 가격경쟁력 - 원료수급	- 섭취량 - 극적 효과 (-10 kg)	- 유럽 소재 - 대사량 증진	- 신원료 - 원료에 대한 국내외인지도
단점	- 섭취량 - 매운 향/맛 - 익숙함	- 불용성 (제형한계) - 원료수급 - 중국 소재	- 고시형 - 섭취량	- 소비자의 부정적인식 (과대광고) - 원료가격	- 원료가격 - 오일상 (제형한계)	- 불용성 (제형한계) - 중국 소재
2017 매출액(억)	-	31.8	294	12.3	70.4	114.3

- 결론적으로, 노바렉스에서는 국내 소재인 ‘고추씨추출물등 복합물’은 체지방 감소 기능성 시장에 효과적으로 진입 가능한 소재로 판단하고 있으며 소재가 가지는 가격경쟁력, 제형의 용이함, 소재의 이미지(고추, 체중감소)는 유효한 마케팅 포인트가 될 수 있다고 판단함. 이에 1. 개별인정형 원료 등록, 2. 컨셉원료 판매의 two-tract으로 개발을 진행하고자 함

## 제 2 절 향후 연구개발결과의 활용계획

- 소재산업 및 제약산업에 응용 가능한 기능성 소재화 : 항비만을 통한 대사개선 개별 혹은 복합 기능성 소재의 활용 및 안정성 확보. 정제과정을 통한 순도 향상에 의해 시약 및 제약산업의 소재로도 활용 가능함 (연구 종료 시부터 판매가 가능하도록 연구 추진)
- 개별 혹은 복합 기능성 소재 함유 다양한 제품 개발 및 marketing 화 : 원료 상태로 공급하는 형태 (시약 및 액상, 분말, 파우더로 공급하는 bulk 원료형태), 완제품 OEM 형태 (원료 판매 및 상품화 공동추진), 자사브랜드 형태 (참여기업인 (주)노바렉스와 공동으로 직접 상품 개발 : (과립포, 드링크, 혈당강하 건강보조식품) 등으로 상품화 전략을 추진함 (연구 종료 시부터 가능하도록 추진)
- 기술이전 (1건) 및 3년간 특허 3건 이상, 지적재산권 확보, 국제학술지 연구논문 4편 및 국내학술지 2편 이상을 발표하여, 본 연구데이터를 기반으로 식품 및 건강기능식품 부원료, 네트워크 업체를 통한 기능성 식품으로 판매하고자 함
- 본 연구에서 최적화 하게 될 개별 혹은 복합 기능성 소재의 분리정제, 함량 및 순도 증진 공정 등은 향후 유사 기능성 소재 분리 정제 공정에 적용하여 연속성 있는 관련 연구를 가능케 함
- 노바렉스가 보유한 국내외 네트워크를 이용하여 국내 박람회(Bio Korea, 식품산업대전 등)와 해외박람회(비타푸드 스위스, SSW 라스베거스, SSW 애너하임, CPHI China 등)에서 지속적인 원료 소개를 통한 해외시장 진출을 꾀하고자 함

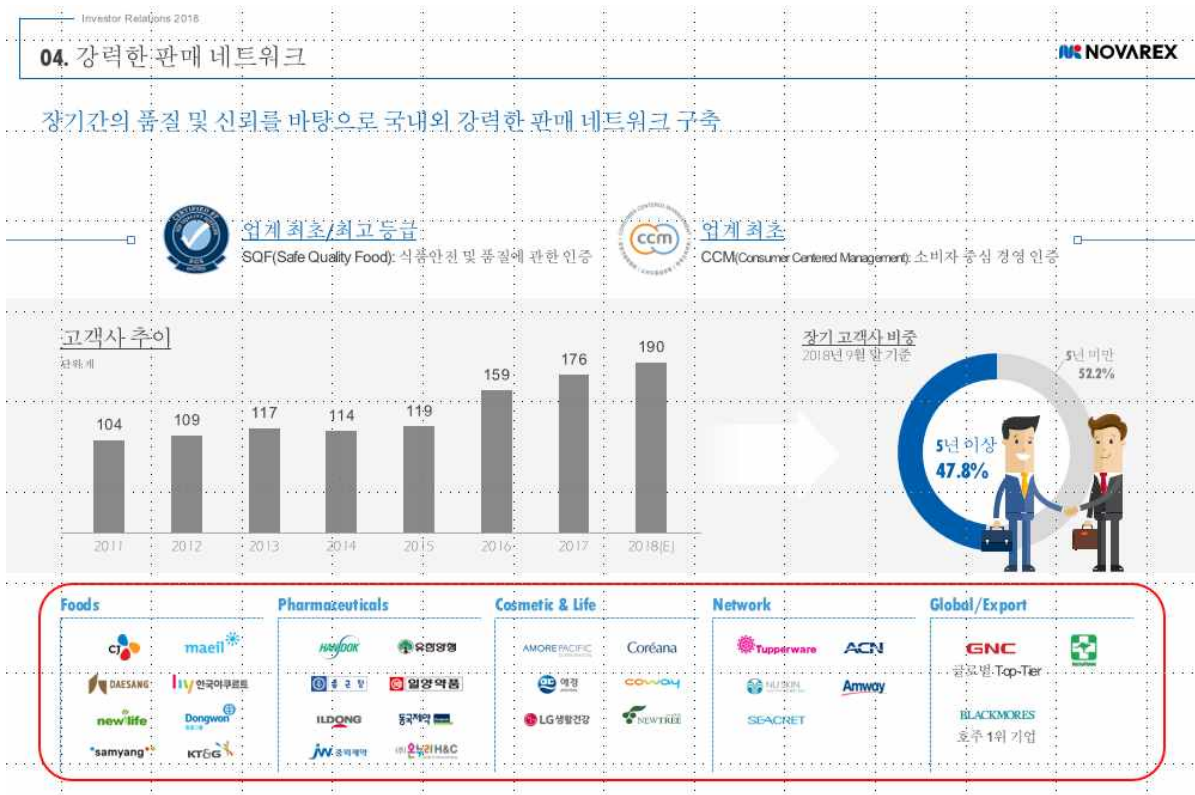


Fig 120. 노바렉스 고객사 네트워크

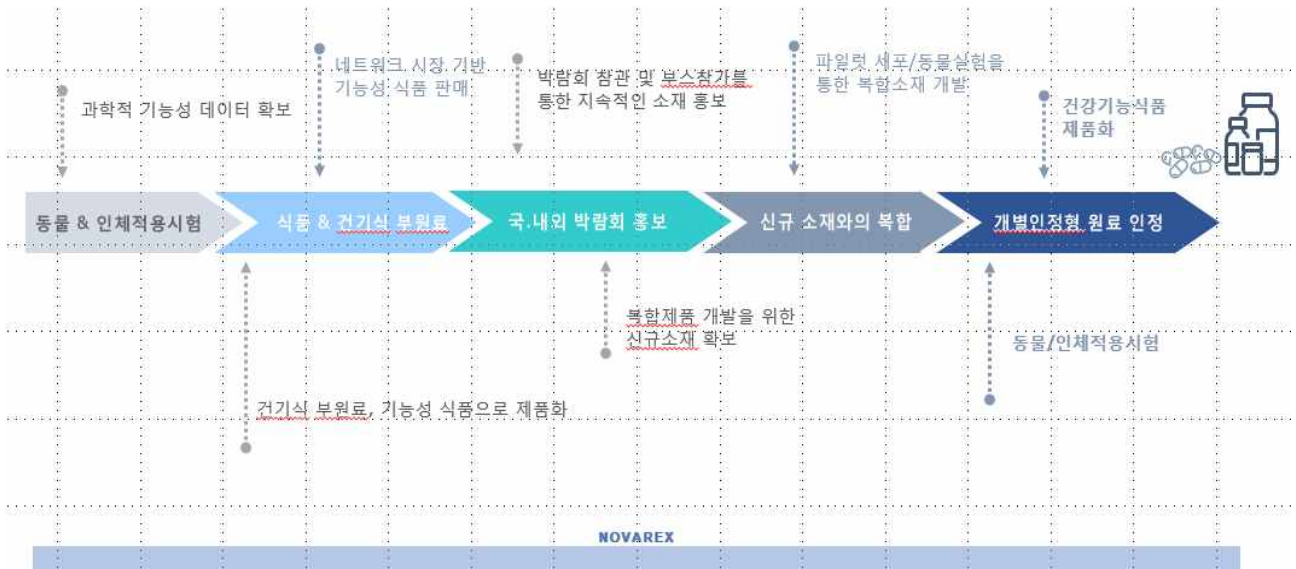


Fig 121. 소재의 예상 판매 & 활용 계획도