

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

수출전략기술개발사업 2019년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003087-01

EGCG 소재 활용 수출전략형 다이어트 및 피부건강개선 제품개발 및 상용화 최종보고서

2020.06.05.

주관연구기관/(주)알앤오식품
협동연구기관/한국화학연구원
대전대산협단
충남대학교병원

농림축산식품부

(전문기관)농림식품기술기획평가원

제 출 문

이 보고서를 “EGCG 소재 활용 수출전략형 다이어트 및 피부건강개선 제품개발 및 상용화에 관한 연구” 과제(세부과제 “EGCG소재 활용 수출전략형 다이어트 및 피부건강개선 제품개발 및 상용화에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2020 .06 .05 .

주관연구기관명 : (주)알앤오식품 류건식 (인)
협동연구기관명 : 대전대산협단 황석영 (인)
한국화학연구원 이미혜 (인)
충남대학병원 윤환중 (인)

주관연구책임자 : 류 건 식
협동연구책임자 : 김 승 형
유 시 용
이 영

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	116133-03	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.11.29. ~ 2019.11.28	단 계 구 분	총 단 계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	수출전략기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당없음)			
	세부 과제명	EGCG소재 활용 수출전략형 다이어트 및 피부건강개선 제품개발 및 상용화			
연구책임자	류 건 식	해당단계 참여연구원 수	총: 명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 천원 민간: 천원 계: 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 18명 내부: 17명 외부: 1명	총 연구개발비	정부: 720,000천 민간: 240,001천 계: 960,001천
연구기관명 및 소속부서명	(주)알앤오식품 기업부설연구소			참여기업명 (주)알앤오식품	
국제공동 연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과 의 보안등급 및 사유					

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요 약 정보	소프트 웨어	화합물	신품종	
								정보	실물
등록· 기탁 번호	The Amer. J. Chin. Med. 48(3) 1-15	10-2019- 0113722							
	한국생약학회지 49(4) 328-335	10-2019- 0121437							
	한국작물학회 27(2) 143-150								
	한국생약학회지 50(3) 198-204								

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설·장 비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성
합니다) 보고서 면수

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>기존 녹차 소재의 비호감을 개량하여 비만억제뿐만 아니라 피부건강개선의 복합기능을 갖는 새로운 식품소재로 개발하여 기존 제품들과 차별화함으로써 제품 매출과 국민건강 증진에 기여할 필요가 있음.</p> <p>EGCG 고함유 녹차추출물 제조 특허기술에 대한 공정을 개선하여 대량생산화하고 본 소재 기반의 건강기능식품 제품화를 위한 소재의 표준화 및 규격화, 표준공정(SOP) 설정, 양산화 구축, 제형제제화, 제품디자인 등을 개발하였을 뿐만 아니라 탈카페인, EGCG 고함유 녹차소재에 대한 피부주름억제 작용기전 및 전임상연구, 인체적용시험 등을 수행하여 그 유효성을 평가하였음.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<p>탈카페인, EGCG 고함유 녹차추출물 기반의 비만억제 및 피부건강개선복합 기능의 건기식 소재화 및 제품화의 완성도를 높였으며 본 소재의 작용기전 연구에서 입증된 피부주름억제 기능이 임상시험에서는 유의적 유효성 결과를 보여주지 못한 아쉬움이 있으나 섭취량을 높여 진행 중인 추가 인체적용시험의 결과를 기대하고 있음.</p>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>본 EGCG 고함유 녹차소재를 기반으로 하여 다이어트 건강기능식품의 제품화 방향을 설정하고 여기에 시중의 다른 경쟁 소재와 차별화하기 위하여 비만억제 기능에 피부건강개선의 복합기능을 갖는 제품화를 목표로 함. 과제 수행 기간 중에 본 소재가 고시형 녹차추출물로 인정됨에 따라 완제품의 조기 런칭이 가능해 졌지만 피부주름억제 인체적용시험에서 유의적 평가가 도출되지 못하여 섭취량을 높여 추가로 진행하고 있는 임상시험 결과가 나오기까지 출시가 지연되고 있음. 그 결과에 따라 개별인정에서 <기능성 추가> 인정을 받아 비만억제 기능에 피부주름억제 복합 기능의 건기식 제품을 상용화하는데 활용하게 될 것임.</p> <p>본 소재를 활용한 원료제품, 건기식제품(캡슐), 커피 맞춤형 기능성첨가제(스틱)의 3개 품목이 출시될 예정으로 본 연구개발 성과로 향후 매출 증대에 크게 기여할 것임. 또한 본 연구개발을 통해 도출될 추가 결과물들은 논문, 특허, 학술발표 등 형식으로 발표되어 관련산업의 발전에 기여할 것임.</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	에피갈로카테킨갈레이트	다이어트	피부건강개선	건강기능식품	상용화
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	EGCG	Diet	Skin care	Functional health food	Commercialization

* 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

목 차

제1장 연구개발의 개요	1
제1절 연구개발의 배경 및 필요성	1
제2절 연구범위	2
제2장 국내외 기술개발 현황	3
제1절 연구 대상기술의 개요	3
제2절 경쟁기술과의 비교	4
제3절 국내외 시장동향	5
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	8
제1절 EGCG 고함유 녹차소재의 표준화	8
제2절 EGCG 고함유 녹차소재의 규격화	46
제3절 EGCG 고함유 녹차소재의 제조공정 최적화	47
제4절 녹차소재의 탈카페인화 공정 개선 연구	51
제5절 녹차소재의 점진적 양산화 및 시생산(Pilot)	61
제6절 시제품 개발을 위한 배합실험 및 제형제제화	67
제7절 제품디자인 개발	75
제8절 임상시험제품의 설계 및 제작	79
제9절 피부주름억제 전임상시험 및 작용기전 연구	92
제10절 피부주름억제 인체적용시험	126
제11절 건기식 고시형원료서의 EGCG 고함유 녹차소재	166
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	174
제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획	177
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	181
제7장 연구시설·장비 현황	181
제8장 참고문헌	182

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제1절 연구개발의 배경 및 필요성

1. 전 세계 20세 이상 성인의 30%를 차지할 만큼 비만 인구가 폭발적으로 증가하고 있는 실정으로 WHO는 비만을 21세기 신종 전염병으로 규정하고 있다.
2. 고령화 사회 진입에 따른 건강에 대한 관심 고조, 식생활 변화에 따른 비만은 당뇨병 및 심혈관질환 등 생활습관형 질환을 야기하는 주요 원인이 될 뿐만 아니라 젊은 세대의 몸짱, 얼짱 욕구에 따른 뷰티산업의 성장 등 사회 환경 변화에 따른 이너뷰티 및 다이어트 산업이 고성장하고 있는 현실이다.
3. 국내 건강기능식품 산업은 꾸준히 10%대 성장을 하고 있으나, 히트 상품의 종류는 매년 바뀌는 상황으로 이는 소비자들이 건강기능식품 소비에 있어서 브랜드보다는 기능성 신물질에 대한 선호가 높음을 보여 주는 것이다.
4. 제품의 경쟁요소 중에는 어떤 소재이냐가 가장 중요한데 국내외적으로 다이어트 건기식 중 가르시니아캄보지아추출물, 공액리놀렌산 등과 같은 식욕억제제들이 소비자들로부터 큰 호응을 얻고 있으나 이들의 일부 부작용을 감수해 가며 섭취하고 있는 실정이다.
5. 반면 녹차는 역사 이래 오래전부터 ‘살빠지는 약’ 지방분해제로 사용되어 오고 있음에도 불구하고 떫은맛과 카페인 함유 등의 이유로 녹차의 활용도는 그리 크지 않다고 할 수 있다.
6. 21세기 초 유럽, 미국, 일본을 중심으로 이런 녹차의 단점을 개량하려는 시도가 경쟁적으로 시작되면서 기존 비만억제제들의 대체제로 각광을 받고 있다.

7. 따라서 본 과제에서는 녹차 비호감의 원인인 떫은맛과 카페인을 제거한 새로운 탈카페인, 카테킨 고함유 녹차소재를 개발할 필요가 있다. 한편 다이어트 건기식 시장의 70% 고객이 20~40대라는 점을 감안할 때 그들의 주된 니즈(욕구)가 다이어트 뿐만 아니라 피부건강에 있기 때문에 피부주름억제 기능을 추가한 기능성 강화 제품으로 개발하여 다이어트 경쟁 제품들과 차별화할 필요가 있다.
8. 국내시장에는 34종의 녹차추출물 관련 제품들이 출시되어 있는데 이중 (주)아모레퍼시픽 외 기타 제품들은 모두 수입원료를 사용하고 있는 실정이며 아모레퍼시픽사가 자체 생산하는 녹차소재도 카페인을 다량 함유할 뿐만 아니라 주기능성 성분인 카테킨 함량이 매우 저조하여 글로벌 경쟁사 제품들에 비해 품질 경쟁력이 매우 떨어지는 상황으로 품질 및 가격 경쟁력 있는 소재 개발이 절실히 요구되고 있다.

제2절 연구 범위

1. (주)알앤오식품이 기 보유하고 있는 탈카페인, 카테킨 고함유 녹차추출물(EGTE) 소재 제조 특허기술을 활용하여 건기식 제품화를 완성하는 영역까지 연구 범위로 설정한다.
2. 소재의 제조기술은 확보되어 있으나 과연 이 녹차소재가 피부주름억제 기능을 갖는지, 섭취해도 몸에 안전한 것인지 등이 검토되어야 하며 제조 공정 면에서 품질 및 가격 경쟁력을 갖추었는지 등을 검토한다.
3. 또한 식품소재로서의 완성도를 높이기 위하여 소재의 표준화 및 규격화, 표준공정(SOP), 소재의 안정성, 제품의 제형및제제화 등을 검토한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

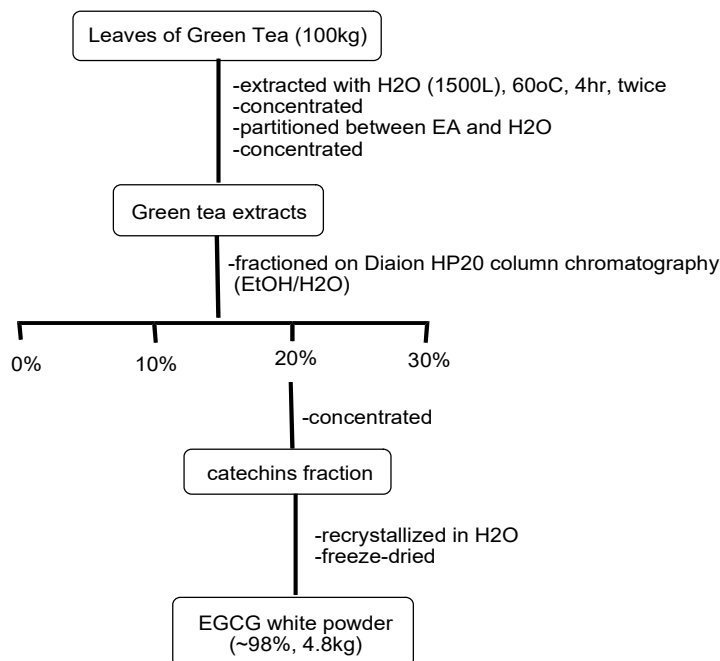
제1절 연구개발 대상기술의 개요

1. 개요

본 특허기술은 녹차 건엽으로부터 4개 공정(추출, 분획, 분배, 재결정)을 거쳐 탈카페인, 고순도 EGCG를 분리정제하는 기술로서, 열수 추출, 크로마토그래피 분획공정 도입으로 EGCG 고함유(~80%)하는 茶카테킨 혼합물을 제조한 후, 물을 이용한 재결정화로 초고순도 EGCG(98%)를 제조하는 기술이다.

본 기술은 친환경적 제법으로, 천연 고기능성 유용성분을 식품소재로 활용하기 위하여서 통상의 분리정제 기술이 아닌 제한된 재료(물, 주정)만을 가지고 고순도 소재를 생산해내는 고도의 기술이며 특히 재결정화는 EGCG 소재 양산화 과정에서 전 세계적으로 처음으로 시도된 기술로 그 활용적 가치는 매우 크다고 할 수 있다.

2. 대상기술의 소개



제2절 경쟁기술과의 비교

1. 경쟁사 특허기술

구분	DSM(네덜란드)	(주)아모레퍼시픽	알앤오식품
특허출원	2000년~2006년	2001년	2014년
특허등록	2008년~2014년	2004년	2016년
주요기술	·EGCG 혼합물 제조 기술 ·대공극성 극성 수지 지상 및 적당한 극성 용출이동상을 사용한 크로마토그래피법 ·고순도(90%~94%) EGCG 분리 공정 기술 ·막모듈을 이용한 EGCG 고순도화 공정 기술 등	카페인-EGCG 결합 및 분리기술 및 합성흡착제 이용한 크로마토그래피법을 통해 녹차 추출물로부터(30%~50%) 고순도 EGCG 분리 공정 기술	·수용액 급냉 공정 및 역상컬럼크로마토그래피법을 통한 80%이상 EGCG 추출 및 분리기술 ·추가 1회이상 수용액상 재결정화를 통한 90~98% 고순도 EGCG 분리 공정 기술
대량 생산화	“Teavigo”라는 브랜드명으로 시장 선도	활용하지 못하고 있음	양산화 중
시장 점유	건강식품 분야에서 세계적 점유도 높음	국내/중국에서 화장품 분야에서 점유도 높은 편	제품개발 중
비고	2014년 Taiyo社로 Teavigo 브랜드명 라이선스 넘김	고순도 EGCG 납품 재료 적용 화장품 출시	수용액 처리 공정 비중 높아 친환경적 장점이 있으며 국내 생산품임

2. 대상기술의 핵심 사항

가. 고순도: 네덜란드 DSM사, 일본 Taiyo사 등 해외 선진기업의 EGCG 고 함유 소재의 경우 순도가 90~95% 정도에 이르지만, 본 기술은 EGCG 98% 이상의 고순도 원료를 제조할 수 있음. 또 해외 경쟁사는 소량의 카페인이 잔류하는 반면 본 기술 제품은 caffeine-free이다.

나. 안전성: 해외 선진기업에서 생산된 소재들의 스펙에 잔류용매와 카페인 항목이 확인되는 것으로 보아 제조공정에서 유기용매를 사용했을 가능성이 있음. 본 기술은 유기용매를 배제하고 물을 이용하여 재결정함으로써 잔류용매 유해성을 최소화하였다.

다. 원가우위: 물을 사용함으로써 생산원가 절감 면에서 우위성이 있다.

라. 생산수율: 일반적으로 재결정법은 수율이 낮은 것이 단점이지만, EGCG의 경우 최적 조건에서 반복 재결정화를 통해 전량을 회수할 수 있기 때문에 상대적으로 수율이 높은 편이다.

제3절 국내외 시장동향

1. 해외 동향: 현재 EGCG 소재 건강기능식품은 네덜란드의 DSM사와 일본의 Taiyo사가 과점하고 있다.

글로벌 경쟁사명	제품명	원료명	용도	가격(천원)
①DSM	Teavigo	Tea catechins(EGCG90~94%)	원료용	자료 부족
②Taiyo International	Sunphenon	Tea catechins(EGCG90~95%)		
③Tate & Lyle	Teawell	Tea catechins(EGCG95%)	실험용 (소용량 생산)	
④Danone	Silhouette	Tea catechins		
⑤BASF		Tea catechins		
⑥Blue California		Tea catechins		
⑦Changsha Sunfull Bio-tech LTD	T-full	Tea catechins(EGCG90~95%)		

2. 국내 동향: EGCG 소재를 활용한 건강기능식품은 국내에서는 아직 시장을 형성하지 못하고 있음(생산 능력 부족). 국내 비만억제 건기식 제품은 가르시니아카모보지아추출물 소재 제품이 약 56%를 차지하고 있다.

< 국내 비만억제 건강기능식품 원료별 시장점유율(2012년, 790억)>

소재(원료)명	경쟁사명	가격(천원)	연 판매액(억원)	
그린마테추출물	롯데제과	11	45	5.6%
대두배아추출물	태평양제약	57	26	3.3%
레몬밤추출물	안지오랩	88	10	1.2%
중쇄지방산 함유유지	대상/롯데삼강	37	32	4.0%
콜레우스스포스클리추출물	CJ제일제당	23	28	3.5%

히비스커스등복합추출물	일동제약	-	34	4.3%
L-카르니틴타르트레이트	대상(주)	28	39	4.9%
가르시아캄보지아추출물	CJ,삼성제약외 다수	33~16	440	56%
공액리놀렌산(CLA)	중외제약 외 다수	30~50	102	12.9%
녹차추출물	태평양제약,보령제약	12~38	21	2.6%
기타			13	1.6%

3. 국내외 시장 규모

가. 카테킨시장: 茶카테킨 소비는 아시아가 40%, 미주에서 27%, 유럽에서 26% 소비하고 있음. 특히 일본과 중국에서 병(bottle)으로 출시되는 기능성음료(bottled tea)의 증가세에 따라 아시아에서의 성장이 늘어나고 있다.

나. 이에 따라 글로벌 茶카테킨 시장에서도 중국과 일본이 수출을 주도하고 있다.

다. 해외시장 규모: EGCG 소재를 활용한 제품의 세계시장 규모는 2,500 억원 규모에서 견조한 성장을 할 것으로 예상된다.

라. 국내시장: 현재 EGCG 관련 제품이 국내 시장을 형성하지 못하였음. 향후 본 기술제품이 비만억제 건강기능식품 시장을 잠식할 것으로 예상된다. 현재 비만억제 건기식은 급성장하고 있다.

구분		현재	예상			
		2016	2017	2018	2019	2020
해외시장	규모	2,895	3,065	3,246	3,437	3,640
	성장률	5.9%	5.9%	5.9%	5.9%	5.9%
국내시장	규모	1,225	1,375	1,544	1,733	1,946
	성장률	12.3%	12.3%	12.3%	12.3%	12.3%

<Nutrition Business Journal (2014)>

마. 세계시장의 성격

- (1) 안정성: 녹차는 소비자들에게 워낙 오랜 기간 알려져 왔으므로, EGCG 관련 제품 시장도 소비자들의 신뢰를 바탕으로 안정성을 보이고 있다.
- (2) 성장성: 건강에 대한 관심에 따라 성장률이 매우 크지는 않으나 성장률이 증가하고 있어 시장 규모가 지속적으로 커지고 있다.
- (3) 독점성: 네덜란드의 DSM사와 일본의 Taiyo사의 시장점유율이 가장 크므로, 시장을 과점하고 있는 것으로 판단된다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 EGCG 고함유 녹차소재의 표준화

1. 표준화를 위한 녹차원료(건엽)의 비교

가. 실험 목적

원료로 사용할 국내산 녹차(지역별, 수확 시기별) 건엽을 비교하기 위하여 각각의 EGCG 함량을 비교함으로써 최상의 품질을 선별하고 생산 수율을 재고하여 제조비용을 낮추는데 활용하고자 한다.

나. 실험방법 및 결과

- (1) 하동산(화개농협), 보성산(보성제다), 제주산(장원설녹차) 각각의 봄 원료(5~6월), 여름 원료(7~8월) 건조엽을 구입하여 50g씩을 500mL 물에 넣고 60°C에서 4시간 중탕하여 추출하였다.
- (2) 각 물추출물을 초산에틸(100mL)로 용매분배하고 상층(EA)을 건조시킨 후 물 10mL에 녹인 다음 20uL을 주입하여 HPLC 정량분석하여 각 시료의 면적값을 비교하였다. (Table 1)
- (3) 1.0 mg/mL EGCG 표준품 용액을 기준으로 면적값(72802)을 단순 비교하였다.

Table. 1. 산지별, 재배 시기별 녹차원료의 EGCG함량 비교

	경남 하동산		전남 보성산		제주산	
	봄	여름	봄	여름	봄	여름
20uL시료의 면적값	2810	2417	2649	2023	3822	3217
건엽 1kg당 EGCG함유량 환산	3.86%	3.32%	3.64%	2.78%	5.25%	4.42%

다. 고찰

대체로 제주산 녹차 건엽이 다른 지역산보다 EGCG함량이 높았으며 여름보다는 봄 재배 녹차가 EGCG를 더 함유 하는 것으로 판단되어 본 과제의 실험 재료는 주로 제주산을 구입하여 사용하였다.

2. 지표성분 정량분석법 설정 및 분석법 벨리데이션

가. 연구 목적

건강기능식품 원료로 사용하게 될 ‘EGCG고함유 녹차추출물’ 소재의 함량분석 및 품질관리를 위한 적합한 HPLC 분석법을 개발하고 분석법을 validation 하고자 한다.

카페인을 포함하여 EG, EGC, EGCG, ECG 등 주요 녹차 catechin 성분의 정량분석을 위한 기울기용리방식(gradient) 조건의 HPLC 분석법을 개발하여 EGCG의 함량 및 순도 결정에 적용코자 한다.

나. 실험장비 및 재료

- (1) 고속액체크로마토그래프 (HPLC) 장비의 구성
 - 자외부흡광광도검출기 (Model 500, Chrom Tech[®])
 - 칼럼오븐 (AT-4000 Column Oven, Futecs)
 - ODS 칼럼 (INNO column C18 (4.6 x 250 mm))
 - 실험실 장비 및 소모품
 - 부피플라스크 (10 ml 및 100 ml)
 - 일회용 실린지 (Tuberkulin, 1 ml, NORM-JECT[®])
 - 용출용매 정제용 멤브레인 필터(0.45mm HV, Durapore[®])
 - 액체크로마토그래프용 유리병

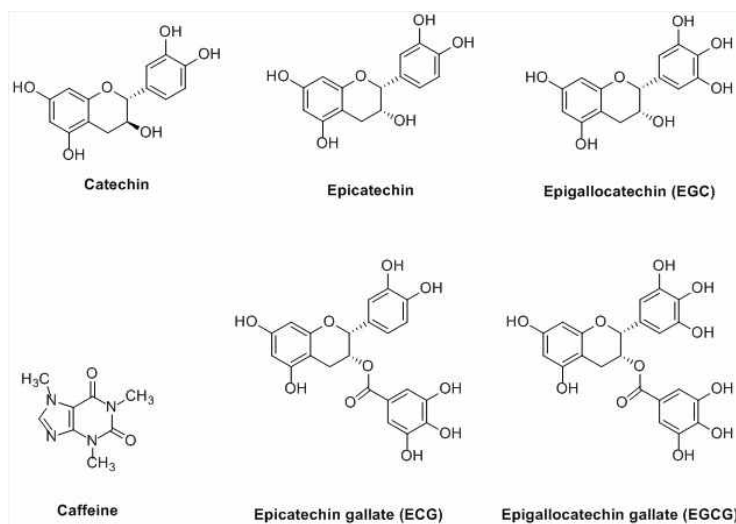
(2) 시험물질

시료명: EGCG고함유 녹차추출물(EGTE)
외관 및 색상: 백색분말
순도: EGCG로 98 % 이상

(3) 표준물질 및 일반시약

(가) 표준물질 : 연구에 사용한 4종의 카테킨 성분은 Sigma Aldrich에서 구입하여 사용하였다.

- ① 에피갈로카테킨((-)-epigallocatechin, EGC)
분자식: $C_{15}H_{14}O_7$, 분자량: 306.27, CAS No.: 970-74-1
- ② 에피갈로카테킨갈레이트((-)-epigallocatechin-gallate, EGCG)
분자식: $C_{22}H_{18}O_{11}$, 분자량: 458.37, CAS No.: 989-51-5
- ③ 에피카테킨((-)-epicatechin, EC)
분자식: $C_{15}H_{14}O_6$, 분자량: 290.27, CAS No.: 490-46-0
- ④ 에피카테킨갈레이트((-)-epicallocatechin-gallate, ECG)
분자량: $C_{22}H_{18}O_{10}$, 분자식: 442.37, CAS No.: 1257-08-5



(나) 일반시약 및 HPLC 용매 : 연구에 사용한 시약은 분석용 시약을 사용하였으며, 사용한 HPLC 용매는 아래와 같다.

명칭	등급	제조원
water	HPLC grade	J.T Baker
acetonitrile	HPLC grade	TEDIA
methanol	HPLC grade	TEDIA
acetic acid	ACS grade	SAMCHUN

(4) 데이터 처리 소프트웨어

명칭	모델명	제조원
HPLC data Acquisition	MultiChro 2000 V4.2	Futechs
Microsoft Office Excel	2010	Microsoft co.

다. 시험방법

(1) 이동상의 조제

(가) Solution A : 0.1% Acetic acid in water 1L를 bottle 에 옮기고 acetic acid 1 ml을 첨가한 후 교반하고, 10분간 초음파 처리하여 탈기 후 membrane filter로 여과하여 사용하였다.

(나) Solution B : Acetonitrile 1 L를 bottle 에 옮기고, 10분간 초음파 처리하여 탈기하고 같은 방법으로 membrane filter로 여과하여 사용하였다.

(2) 표준원액 및 표준용액의 제조

(가) 표준원액의 조제

표준물질 EGCG98 0.0100 g 을 전자저울을 이용하여 칭량 후, 10 ml 부피플라스크에 넣고 증류수를 표선까지 첨가하였다. (농도 1,000 ug/ ml)

(나) 표준용액의 조제

표준원액을 증류수로 아래와 같이 계열 희석하며, 각각의 표준용액은 vortex mixer를 사용하여 혼합하였다.

(다) 검량선 시료 (Standard, STD)의 조제

각 농도별 표준용액 및 이동상을 아래와 같이 제조하며, 각 단계별 검량선 시료를 사용하였다.

Sample name	Final Conc.($\mu\text{g}/\text{mL}$)
EGCG98, 50ppm	50
EGCG98, 100ppm	100
EGCG98, 200ppm	200
EGCG98, 400ppm	400

(3) HPLC 분석조건:

시료 액은 0.2 μm syringe filter로 여과하여 분석에 사용하였으며 INNO column C18 (4.6x250 mm) 컬럼을 사용하였다. 이동상 A (아세트나이트릴)와 B (물 in 0.1 % 아세트 에시드)를 1.0 ml/min 의 흐름 속도로 기울기 용매 조건으로 용출시켜 분석하였다. 시료 주입량은 100 μl 이며, Oven 온도는 35 $^{\circ}\text{C}$ 이고 검출 파장은 UV 280 nm에서 측정하였다. 자세한 조건은 Table 1.에 나타내었다.

Table 1. HPLC running condition

Solvent elution	gradient
0.1 % acetic acid : acetonitrile	00~12min - 90:10, 12~25min - 85:15 25~28min - 70:30, 28~30min - 90:10
Flow rate	1.0ml/min
Detection	UV detector (280nm)
Column	INNO column C18 (4.6x250 mm)
Injection volume	20 μl

라. 데이터 처리

검량선 작성, 농도 산출 등은 MultiChro2000 V4.2, Futecs co. 프로그램을 사용하였으며, 정확성, 정밀성 및 표준편차를 산출하기 위해 Microsoft Office Excel 2010 사용 하였다. 검량선은 x축에 농도를, y축에 피크면적비를 이용하여 최소자승법으로 작성 하였다. 농도는 피크면적비를 검량선 계산식($y=ax\pm b$)에 대입하여 산출하였다.

조제물의 농도 = 측정농도 X 회석배율

마. 분석법의 validation

분석방법의 적합성을 알아보기 위하여 다음과 같이 시스템적합성 (System suitability), 특이성 (Specificity), 직선성 (Linearity), 일내정밀성 (Intra-day precision), 일간정밀성 (Inter-day precision), 정확성 (accuracy), 최소정량한계(LOQ) 및 최소검출한계(LOD) 등을 검토하였다.

(1) 시스템적합성 (System suitability)

각 시료를 5 회 반복 측정하여 정밀성을 산출한 후, 시스템 적합성의 판정기준은 피크면적비와 retention time 의 정밀성이 각각 10% 이하인 경우 적합으로 판정하였다.

(2) 특이성 (Specificity)

시료의 retention time 과 동일한 위치에서 간섭피크의 유무를 관찰하였다. 특이성의 판정기준은 분석물질의 피크가 정량에 충분한 형상을 나타내며, 분석물질과 동일한 retention time에서 간섭피크가 나타나지 않은 경우 적합으로 판정하였다.

(3) 직선성 (Linearity)

시료를 각 농도(0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05%)별로 조제한 후, HPLC분석을 실시하여 얻어진 각 농도별 피크의 면적값을 산출하고, 이를 바탕으로 검량선을 작성하였으며 검량선의 회귀방정식과 상관계수(R^2)를 구하였다. 상관계수 R^2 의 값이 0.99 이상인 경우 적합으로 판정하였다.

(4) 일내정밀성 (Intra-day precision)

시료를 농도(0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05%)별로 조제한 후, 각 농도별 검체를 각각 30분 간격으로 4회 반복 측정하였다. 각 회차별로 피크의 면적비와 retention time을 구하였으며 각 회차에서 측정된 피크의 면적비와 retention time의 평균치와 상대표준편차를 구하였다. 일내정밀성은 피크의 면적비의 상대표준편차(RSD) 값 및 retention time의 상대표준편차 (RSD) 값으로 나타내었으며 RSD값이 각각 10.0 이하인 경우 적합으로 판정하였다.

(5) 일간정밀성 (Inter-day precision)

시료를 농도(0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05%)별로 조제한 후, 각 농도별 검체를 각각 1일 간격으로 3일간 반복 측정하였다. 각 측정일별로 피크의 면적비와 retention time을 구하였으며 각 측정일에서 측정된 피크의 면적비와 retention time의 평균치와 상대표준편차를 구하였다. 일간정밀성은 피크의 면적비의 상대표준편차(RSD) 값 및 retention time의 상대표준편차(RSD) 값으로 나타내었으며 RSD값이 각각 10.0 이하인 경우 적합으로 판정하였다.

(6) 정확성 (accuracy)

시료를 농도(0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05%)별로 조제한 후, 각 농도별 검체를 4회 반복 측정하였다. 각 농도별 검체의 peak area와 retention time의 평균값 \pm 표준오차를 구하였다. 정확성은 표준오차 10.0 미만인 경우 적합으로 판정하였다.

(7) 최소정량한계 (LOQ) 및 최소검출한계 (LOD)

검출한계 (limit of detection, LOD)와 검량한계 (limit of quantification, LOQ)는 시그널 대 노이즈 비 (S/N ratio)가 각각 3배 (LOD)와 10배 (LOQ) 되는 농도로 정하였다.

바. 연구결과 및 고찰

(1) HPLC 분석방법의 개발

녹차에 존재하는 EGCG를 포함한 Catechin 성분의 분석법으로는 일반적인 분석법으로는 주석산 철을 이용하여 탄닌의 양으로 간이 비색정량하는 방법이 알려져 있다. 최근에는 HPLC 기기를 사용하여 catechin류를 분석하는 방법이 많이 개발되고 있다.

한편, 본 연구에서는 ‘EGCG고함유 녹차추출물’ (EGTE) 소재의 품질평가 시험법 및 안정성 연구 등에 널리 활용하고자 EGCG를 포함한 EG, EGC, EGC 등 주요 녹차 catechin 성분들을 동시 정량할 수 있는 간편한 HPLC 분석방법을 개발하였다.

개발된 HPLC 방법은 acetonitrile 과 water를 이동상으로 하여 기울기용리 방식(gradient)으로 용출하여 각 catechin 성분은 물론 녹차에 다량으로 함유된 caffeine 성분도 동시정량 할 수 있었다.

EGCG를 포함한 EG, EGC, EGC 등 주요 녹차 catechin 성분들의 retention time은 각각 EGC 12.4 min, Caffeine 14 min, EC 16 min, EGCG 16.6 min, Catechin 17.1 min, EGC 21.3 min에서 관찰되어, 이들 peak 들은 서로 간섭이 일어나지 않았으며, peak의 모양 및 특이성이 우수하게 나타난 바 본 분석방법은 녹차의 함유된 Catechin 성분 및 Caffeine 성분을 동시분석하기에 적합한 방법으로 사료된다. (Fig 1 and Fig 2)

또 본 HPLC 분석방법에 따라 EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) 소재의 품질 평가를 수행하여본 결과 EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) 소재는 EGCG를 98% 이상 함유하고 있으며 ECG가 소량 (2% 미만) 함유되어 있음을 알수 있었으며 caffeine 성분은 전혀 검출되지 않았다.

한편 Sigma사에서 시판되고 있는 분석용 표준품 (analytical grade) EGCG 역시 0.6 % 정도의 ECG를 함유하고 있었다. 따라서 EGCG98 소재는 고순도 EGCG 소재로서 충분조건을 갖추고 있음을 거듭 확인할 수 있었다.

(Fig 3, Fig 4 and Fig 5)

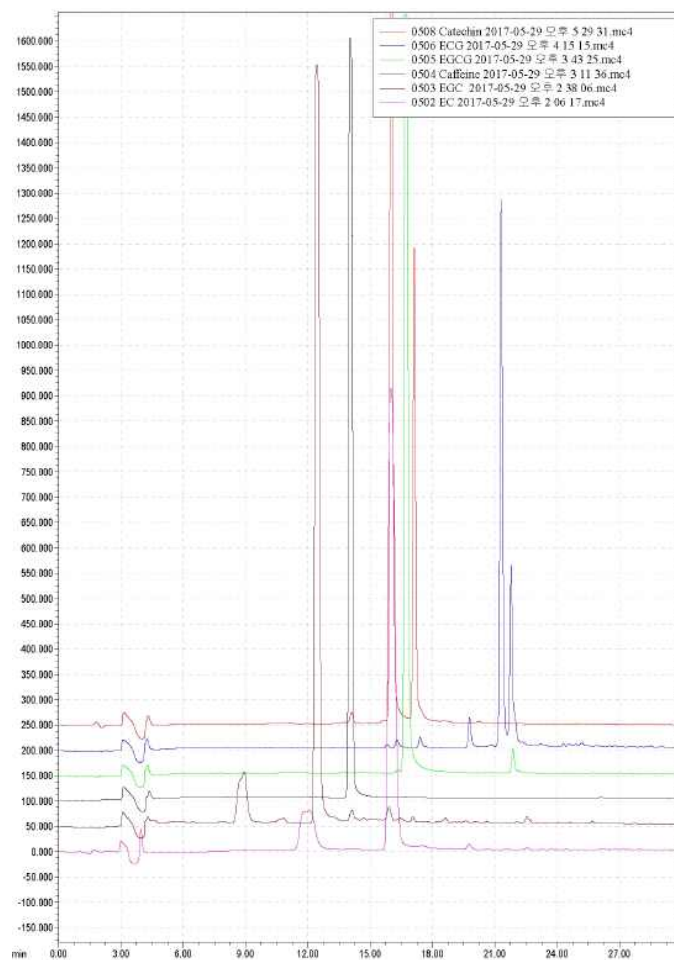


Fig 1. HPLC chromatogram of major components in green-tea

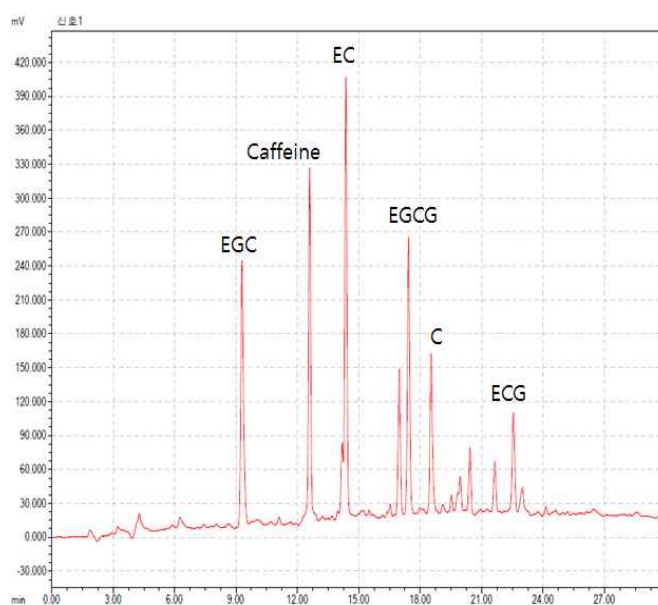


Fig 2. HPLC Chromatogram of whole green-tea extract

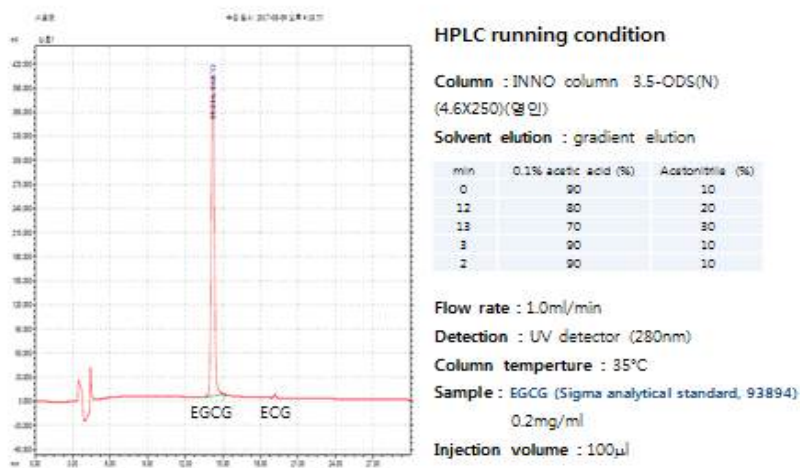
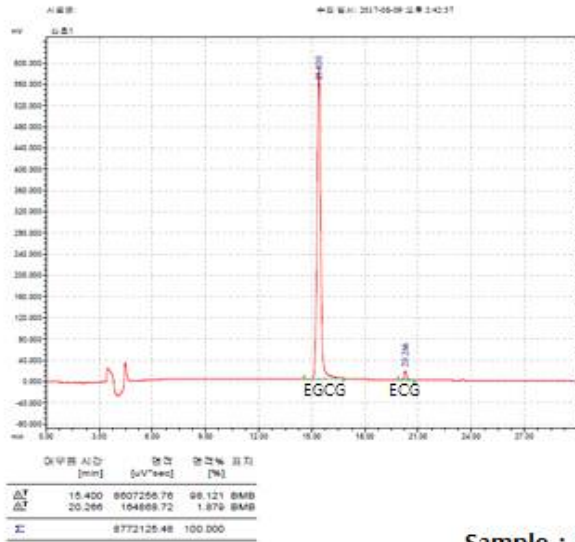


Fig 3. HPLC Chromatogram of standard EGCG (analytical grade, Sigma)



Sample : 알앤오식품EGCG

Fig 4. HPLC Chromatogram of EGCG고함유 녹차추출물(EGTE)

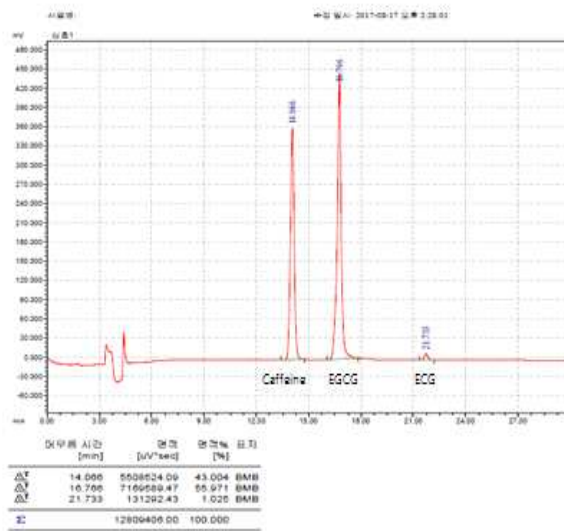


Fig 5. HPLC Chromatogram of [EGCG고함유 녹차추출물 (EGTE) + caffeine]

(2) 분석법의 validation

① 시스템적합성 (System suitability)

각 시료를 4 회 반복 측정하여 정밀성을 산출한 후, 시스템 적합성의 판정기준은 피크면적비와 retention time 의 정밀성은 모든 실험 농도에서 각각 3.0 % 미만으로 산출되어 우수한 시스템적합성을 보여주었다.

(Table 2, Table 3)

② 특이성 (Specificity)

시료의 retention time 과 동일한 위치에서 간섭피크의 유무를 관찰한 결과 Fig 1 및 Fig 2와 같이 EGCG를 포함한 EG, EGC, ECG 등 주요 녹차 catechin 성분들은 물론 caffeine의 경우에 있어서도, 각 시료의 피크들은 모두 정량분석에 충분한 형상을 나타내었으며, 분석물질과 동일한 retention time에서 간섭피크 가 전혀 나타나지 않아 우수한 특이성을 나타내었다.

③ 직선성 (Linearity)

시료를 각 농도(0.4%, 0.2%, 0.1%, 0.05%)별로 조제한 후, HPLC분석을 실시하여 얻어진 각 농도별 피크의 면적값을 산출하고, 이를 바탕으로 검량선을 작성하였으며 검량선의 회귀방정식과 상관계수 (R^2)를 구하였다. 검량선의 회귀방정식은 $y = 27424.21 x + 20229.75$ 으로 계산되었으며, 상관계수 R^2 값은 0.9998 로 산출되어 우수한 직선성을 나타낼 수 있었다. (Fig 6)

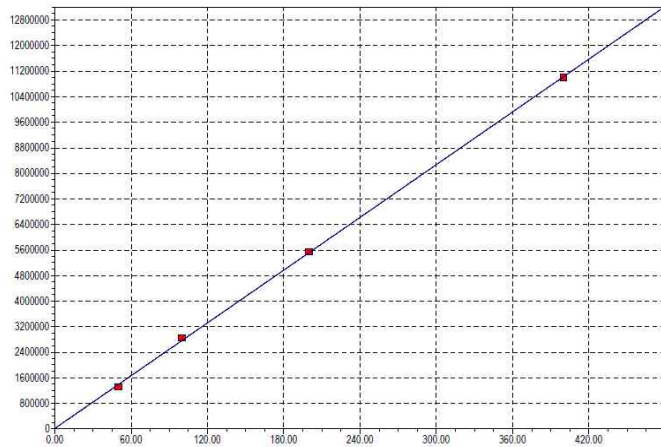


Fig 6. Calibration curve of EGCG

④ 일내정밀성 (Intra-day precision)

EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) 시료를 각각 0.05 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.4 %을 조제한 후, 30분 간격으로 4회 반복측정하고 retention time 및 peak area 의 평균값 및 상대표준편차(RSD) 값을 구하였다. 0.4 % 수용액의 경우 retention time은 $14.1 \text{ min} \pm 0.15$ 로 관찰되었으며 상대표준편차는 1.06으로 나타나 우수한 정밀성을 보여주었다. peak area의 경우도 110520 ± 1397 , 상대표준편차 1.26으로 산출되어 우수한 정밀성을 보여주었다.

이하 0.2 % 수용액, 0.1 % 수용액, 0.05 % 수용액의 경우에도

retention time $14.1 \text{ min} \pm 0.15$, $14.1 \text{ min} \pm 0.15$ 및 $14.1 \text{ min} \pm 0.15$ 로 관찰되었으며 상대표준편차는 각각 1.65, 1.81, 0.68 으로 산출되었다. peak area의 경우도 52276 ± 677.91 , 24608 ± 972.81 , 및 11756 ± 219.82 으로 관찰되었으며 상대표준편차는 각각 1.30, 3.95 및 1.87 으로 산출되어 우수한 일 내정밀성을 나타내었다. (Table 2) Table 2. Intra-day precision test of EGCG고함유 녹차추출물(EGTE)

	T1(0.4%)	T2(0.4%)	T3(0.4%)	T4(0.4%)	MEAN	RSD
peak area	108470	110770	111340	111480	110520	1.26
R.T (min)	14.3	14.2	14	14	14.1	1.06
	T1 (0.2%)	T2 (0.2%)	T3 (0.2%)	T4 (0.2%)	MEAN	RSD
peak area	51938	52034	53286	51845	52276	1.30
R.T (min)	14.3	14.3	14.8	14.4	14.5	1.65
	T1 (0.1%)	T2 (0.1%)	T3 (0.1%)	T4 (0.1%)	MEAN	RSD
peak area	24903	24676	25585	23269	24608	3.95
R.T (min)	14.3	14.8	14.7	14.3	14.5	1.81
	T1 (0.05%)	T2 (0.05%)	T3 (0.05%)	T4 (0.05%)	MEAN	RSD
peak area	11433	11923	11851	11817	11756	1.87
R.T (min)	14	14.1	14.2	14	14.1	0.68

⑤ 일간정밀성 (Inter-day precision)

EGCG고함유 녹차추출물 (EGTE) 시료를 각각 0.05 %, 0.1 %, 0.2 %, 0.4 %을 조제한 후, 1일 간격으로 3회 반복측정하고 retention time 및 peak area 의 평균값 및 상대표준편차(RSD) 값을 구하였다. 0.4 % 수용액의 경우 retention time은 $14.4 \text{ min} \pm 0.26$ 로 관찰 되었으며 상대표준편차는 1.84로 나타나 우수한 정밀성을 보여주었다. peak area의 경우도 108483 ± 3539 , 상대표준편차 3.26으로 우수한 정밀성을 보여주었다. 이하 0.2 % 수용액, 0.1 % 수용액, 0.05 % 수용액의 경우에도 retention time $14.27 \text{ min} \pm 0.45$, $14.40 \text{ min} \pm 0.26$ 및 $14.17 \text{ min} \pm 0.06$ 로 관찰되었으며 상대표준편차는 각각 3.16, 1.83, 0.41 으로 산출되었다. peak area 의 경우도 53044.67 ± 1254.55 , 26844.33 ± 1133.27 , 및 12518 ± 515.29 으로 관찰되었으며 상대표준편차는 각각 2.37, 4.22 및 4.12 으로 산출되어 우수한 일간정밀성을 나타내었다. (Table 3)

Table 3. Inter-day precision test of EGCG98

0.4%	D1	D2	D3	AVERAGE	SD	RSD
peak area	110230	110810	104410	108483	3539	3.26
R.T	14.6	14.1	14.5	14.40	0.26	1.84
0.2%	D1	D2	D3	AVERAGE	SD	RSD
peak area	53410	54076	51648	53044.67	1254.55	2.37
R.T	14.3	13.8	14.7	14.27	0.45	3.16
0.1%	D1	D2	D3	AVERAGE	SD	RSD
peak area	27782	27166	25585	26844.33	1133.27	4.22
R.T	14.3	14.2	14.7	14.40	0.26	1.84
0.05%	D1	D2	D3	AVERAGE	SD	RSD
peak area	12813	12818	11923	12518.00	515.29	4.12
R.T	14.2	14.2	14.1	14.17	0.06	0.41

⑥ 정확성 (accuracy)

시료를 농도 (0.4 %, 0.2 %, 0.1 %, 0.05 %)별로 조제한 후, 각 농도별 검체를 4회 반복 측정하였다. 각 농도별 검체의 peak area와 retention time의 mean \pm SE 를 구하였다. 0.4 % 수용액의 retention time은 100 ± 0.53 , peak area는 100 ± 0.63 , 0.2 % 수용액의 retention time은 100 ± 0.82 , peak area는 100 ± 0.65 , 0.1 % 수용액의 retention time은 100 ± 0.91 , peak area는 100 ± 1.98 , 및 0.05 % 수용액의 retention time은 100 ± 0.34 , peak area는 100 ± 0.93 으로 산출 되어, 표준편차는 모두 1.0 이하의 값을 나타내었다. (Table 4)

Table 4. Accuracy test of standard concentration

0.4%	T1	T2	T3	T4	mean ± SE
peak area	108470	110770	111340	111480	100 ± 0.63
R.T	14.3	14.2	14	14	100 ± 0.53
0.2%	T1	T2	T3	T4	mean ± SE
peak area	51938	52034	53286	51845	100 ± 0.65
R.T	14.3	14.3	14.8	14.4	100 ± 0.82
0.1%	T1	T2	T3	T4	mean ± SE
peak area	24903	24676	25585	23269	100 ± 1.98
R.T	14.3	14.8	14.7	14.3	100 ± 0.91
0.05%	T1	<T2	T3	T4	mean ± SE
peak area	11433	11923	11851	11817	100 ± 0.93
R.T	14	14.1	14.2	14	100 ± 0.34

⑦ 최소정량한계 (LOQ) 및 최소검출한계(LOD)

검출한계 (limit of detection, LOD)와 검량한계 (limit of quantification, LOQ)는 시그널 대 노이즈 비 (S/N ratio)가 각각 3배 (LOD)와 10배 (LOQ)되는 농도로 정하였다.

분석 검출법의 예민도를 나타내는 기준인 검출한계 (LOD)와 정량한계 (LOQ)를 산출한 결과 검출한계 (LOD)는 0.02 ~ 0.04 ppm 검량한계(LOQ)는 0.06 ~ 0.12 ppm의 값을 산출되었다.

사. 결론

신규 건강기능식품 소재 ‘EGCG고함유 녹차추출물’의 품질평가지험법 및 표준화 공정에 활용할 수 있는 새로운 HPLC 분석법을 개발하고 아울러 HPLC 분석방법의 분석적합도 및 타당성 평가를 위한 validation 연구를 수행하였다. HPLC 분석법은 EGCG를 포함한 EG, EGC, ECG 등 주요 녹차 catechin 성분들을 동시 정량할 수 있는 간편한 HPLC 분석방법으로서 Zhu 등¹⁸⁾의 방법을 일부 수정하여 사용하였다. Validation 연구로는 특이성 (specificity), 검량선의 직선성(linearity), 일내정밀성(intra-day precision), 일간정밀성(inter-day precision), 정확성(accuracy), 최소정량한계(LOQ) 및 최소 검출한계(LOD) 등을 재검토함으로써 분석방법의 타당성 및 시스템 적합성을 판단하였다.

녹차표준품 시료의 retention time 과 동일한 위치에서 간섭피크의 유무를 관찰한 결과 EGCG를 포함한 EG, EGC, ECG 등 주요 녹차 catechin 및 caffeine의 피크들은 모두 정량분석에 충분한 형상을 나타내었으며, 분석물질과 동일한 retention time에서 간섭피크가 전혀 나타나지 않아 우수한 특이성을 나타내었다. (Fig 2)

EGCG를 포함한 EG, EGC, ECG 등 주요 녹차 catechin 성분들을 모두 Zhu 등¹⁸⁾ 이 보고한 바와 같이 검량선의 상관계수는 모두 0.99이상으로 양호한 직선성을 나타내었으며, 일내정밀성(intra-day precision)은 9% 이하, 일간정밀성(inter-day precision)은 10% 이하, 정확성(accuracy)은 95-105% 로 나타나 모든 항목에서 양호한 시스템 적합성을 보여주었다. 한편 본 연구에서 중점적으로 분석하고자 하는 EGCG 성분에 대하여 피크면적값(peak area)은 물론 retention time에 대한 일내정밀성(intra-day precision), 일간정밀성(inter-day precision), 정확성(accuracy) 등을 재검토하였다.

녹차표준품 EGCG시료를 0.005%, 0.01%, 0.02%, 0.04% 등 농도별로 조제한 후, HPLC분석을 실시하여 얻어진 각 농도별 피크면적값(peak area)을 산출하고, 이를 바탕으로 작성한 검량선의 회귀방정식은 $y = 27424.21 x + 20229.75$ 으로 계산되었으며, 상관계수(R^2)는 0.9998 로 산출되어 우수한 직선성을 나타내었다. 또 각 농도별 시료를 30분 간격으로 4회 반복측정하고 retention time 및 피크면적값(peak area)의 평균값 및 상대표준편차(RSD) 값을 구하여 본 결과 0.04% 수용액의 경우 retention time의 상대표준편차(RSD)는 1.06으로 나타났으며 피크면적값(peak area)의 상대표준편차는 1.26으로 각각 산출되어 우수한 일내정밀성을 보여주었다. 또, 0.02% 수용액, 0.01% 수용액, 0.005% 수용액의 경우에도 retention time의 상대표준편차는 1.65, 1.81, 0.68 으로

각각 산출되었으며 피크면적값(peak area) 역시 상대표준편차가 각각 1.30, 3.95 및 1.87 으로 산출되어 우수한 일내정밀성을 나타내었다. 또, 동일시료를 사용하여 1일 간격으로 3회 반복측정한 일간정밀성 실험 역시 0.04% 수용액의 경우 retention time의 상대표준편차가 1.84로 나타났으며 피크면적값(peak area)도 상대표준편차 3.26 으로 우수한 정밀성을 보여주었다. 이하 0.02% 수용액, 0.01% 수용액, 0.005% 수용액의 경우 retention time 및 피크면적값(peak area)의 상대표준편차는 각각 3.16, 1.83, 0.41 및 2.37, 4.22 및 4.12 으로 산출되어 우수한 일간정밀성을 나타내었다. 또 HPLC분석법의 정확성(Accuracy) 평가를 위하여 시료를 농도 (0.04%, 0.02%, 0.01%, 0.005%)별로 조제한 후, 각 농도별 검체를 4회 반복 측정하고 각 농도별 검체의 피크면적값(peak area)과 retention time의 mean \pm 표준편차(SD) 를 구하였다. 0.04%

수용액의 retention time은 100 ± 0.53 , 피크면적값(peak area)는 100 ± 0.63 , 0.02% 수용액의 retention time은 100 ± 0.82 , 피크면적값(peak area)는 100 ± 0.65 , 0.01% 수용액의 retention time은 100 ± 0.91 , 피크면적값(peak area)는 100 ± 1.98 , 및 0.005% 수용액의 retention time은 100 ± 0.34 , peak area는 100 ± 0.93 으로 산출 되어, 표준편차는 모두 1.0 이하의 값을 나타내었다. 또, signal to noise 비율(S/N ratio)이 각각 3배 (LOD)와 10배 (LOQ)되는 농도로 검출한계(limit of detection, LOD)와 검량한계(limit of quantification, LOQ)를 구하여본 결과 검출한계 (LOD)는 2-4 ppm, 검량한계(LOQ)는 6-12 ppm의 값을 나타내었다. (Table 2)

3. 유해성분(카페인, 잔류용매, 대장균 등) 분석법 설정

가. 카페인

(1) 시험법의 요약

본 시험법은 메탄올과 초음파 처리를 이용하여 시료 중 카페인을 충분히 추출하여 액체크로마토그래프/자외부흡광광도검출기를 통해 분석하는 방법으로 카페인의 최대 흡수파장인 280 nm에서 정량분석을 한다.

(2) 장비와 재료

(가) 실험실 장비 및 소모품

부피플라스크(100 mL)
여과용 멤브레인 필터
액체크로마토그래프용 유리병

(나) 분석장비

고속액체크로마토그래프
자외부흡광광도검출기
칼럼오븐
옥타데실실릴화한 칼럼(안지름 4.6 mm, 길이 250 mm, 충전 octa-decyl silica) 또는 이와 동등한 것

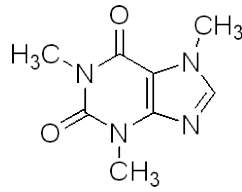
(다) 분석장비의 준비

이동상인 아세토니트릴과 0.1%인산용액을 이용하여 분당 1.0 mL로 충분한 시간동안 흘려 안정화 시킨다.

(3) 표준물질 및 일반시약

(가) 표준물질

카페인(Caffeine, 1,3,7-trimethyl-1H-purine-2,6(3H,7H)-dione-1,3,7-trimethylxanthine, trimethylxanthine, theine, methyltheobromine)
분자식 : $C_8H_{10}N_4O_2$, 분자량 : 194.19, CAS No. : 58-08-2



(나) 일반시약

메탄올(Methanol)

아세토니트릴(Acetonitrile)

초산(Acetic acid)

(4) 시험과정

(가) 표준용액의 조제

표준물질을 메탄올에 녹여 1,000 µg/mL 되도록 표준원액을 만든다.

표준원액을 적당량 희석하여 표준용액으로 한다.

(나) 시험용액의 조제

시료(카페인으로서 20~80 mg) 적당량을 취하여 100 mL 부피플라스크에 넣은 후 메탄올을 가하여 초음파 추출을 한다.

위의 용액을 메탄올을 표선까지 채운 다음, 0.45 µm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 한다.

(5) 분석 및 계산

(가) 기기분석

표 1. 고속액체크로마토그래프 조건(예)

항목	조건
주입량	20 µL
검출기 파장	280 nm
칼럼 온도	40°C
이동상	A : 0.1%초산용액, B : 100%아세토니트릴
유속	1.0 mL/분

표 2. 이동상 조건(예)

시간(분)	A용액(%)	B용액(%)
0	95	5
10	85	15
11	0	100
20	0	100
21	95	5
40	95	5

(나) 계산

$$\text{카페인 함량 (mg/kg)} = S \times \frac{V}{\text{시료채취량 (g)}}$$

S : 시험용액 중 카페인의 농도($\mu\text{g/mL}$)

V : 시험용액의 전량(mL)

나. 초산에틸

(1) 시험방법의 요약

본 시험법은 건강기능식품 중 휘발성물질을 추출하기 위하여 헤드스페이스법을 거친 후 GC 칼럼을 통하여 추출된 용매를 분리하는 방법이다. 분리된 성분은 가스 크로마토그래프 불꽃이온화검출기를 이용하여 정량한다.

(2) 장비와 재료

(가) 실험실 장비 및 소모품

GC용 유리병 (2 mL)

헤드스페이스샘플러용 스크류캡 유리병 (25 mL)

부피플라스크 (100 mL, 50 mL)

막자사발

가스타이트시린지 100, 50 μL

(나) 분석장비

가스 크로마토그래프/불꽃이온화검출기 혹은 질량분석기

헤드스페이스샘플러 (HeadSpaceSampler)

Wax 칼럼 (0.25 mm i.d. \times 30m \times 0.25 μm film thickness), FFAP

칼럼 (0.25 mm i.d. \times 30m \times 0.25 μm film thickness) 혹은 이와 동등한 것

(다) 분석장비의 준비

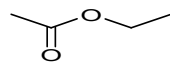
가스 크로마토그래프는 가스를 0.5 mL/min.으로 충분한 시간동안 흘려, 검출기 및 칼럼을 안정화시킨다.

(3) 표준물질 및 일반시약

(가) 표준물질

초산에틸[Ethyl acetate (EA)]

분자식 : $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$, 분자량 : 88.11, CAS No. : 141-78-6



(나) 일반시약

톨루엔(Toluene, HPLC grade)

증류수(Distilled water, HPLC grade)

(4) 시험과정

(가) 표준용액의 조제

초산에틸 1 g을 취하여 100 mL 부피플라스크에 넣는다.

부피플라스크에 톨루엔을 넣어 표선까지 채운 다음,¹⁾ 표준원액으로 사용한다.

앞의 표준원액을 톨루엔으로 적절히 희석하여 1250, 2500, 5000 μ g/mL 표준용액으로 사용한다.

상기용액은 휘발성이 있으므로 휘발성을 최소화한 바이알에 넣음

(나) 검량선 작성용액의 조제

균질화 한 공시험용²⁾ 시료 5 g을 정밀히 취한다.

위의 시료를 25 mL 헤드스페이스샘플러용 유리병에 넣는다.

여기에 가스타이트 시린지를 이용하여 표준원액 1250, 2500, 5000 ppm인 표준용액 100 μ L를 각각 넣은 후 다음의 시험조작에서 검량선 작성용액으로 사용한다. 이 용액은 각각 5, 10, 20 μ g/mL의 농도가 된다.

(다) 시험용액의 조제

균질화 한 시료 5 g을 정밀히 취한다.

위의 시료를 25 mL 헤드스페이스샘플러용 유리병에 넣은 후 시험용액으로 사용한다.

(5) 분석 및 계산

(가) 기기분석

다음 표 1의 조건으로 사용하되 적용되는 기기나 칼럼에 따라 수정이 필요할 수 있다.

표1. 가스크로마토그래프/헤드스페이스샘플러 조건(예)

구분	항목	조건
가스 크로마토 그래프	고정상	FFAP 칼럼(0.25 mm i.d. \times 30 m \times 0.25 μ m) 초기조건 : 40°C에서 5분 정체
	칼럼온도	승온 1단계 1) : 3°C/분으로 50°C 후 5분 정체 승온 2단계 2) : 50°C/분으로 150°C 후 3분 정체
	캐리어가스 및 유량	질소 또는 헬륨, 0.5 mL/분
	분할비율	40 : 1
헤드스페이스 샘플러	주입량	100 μ L
	주입기 온도	120°C
	가열 온도 및 방법	80°C, 흔들면서 가열
	가열 시간	10분
	검출기 온도	250°C
	분석시간	20분

(나) 결과 분석

-표준물질 크로마토그램 및 스펙트럼

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램 상의 피이크는 어느 측정조건에서도 표준용액 피이크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

-정성시험

위의 조건으로 얻어진 크로마토그램 상의 피이크는 어느 측정조건에서도 표준용액 피이크의 머무름 시간과 일치하여야 한다.

-정량시험

검량선 작성 혼합액을 가스크로마토그래프에 주입함으로써 용매들의 검출기 반응을 측정하여 각 성분에 대한 면적을 구하고 검량선을 작성하여 시료 중 초산에틸의 잔류량을 구한다.

(다) 계산

$$\text{초산에틸 } (\mu\text{g/g}) = A \times (B/C) \times D$$

A : 시험용액 중 초산에틸 농도($\mu\text{g/mL}$)

B : 시험용액 전량(mL)

C : 시료 채취량(g)

D : 표준품 순도(%)

시험법 적용표

시험항목	적용규정	시험방법	비고
수분	식품의 기준 및 규격	제9. 일반시험법 1.1.1 수분 ※ II.2.7.1 로얄젤리는 1.1.1.3 칼피서법에 따름	
회분		제9. 일반시험법 1.1.2 회분	
조지방		제9. 일반시험법 1.1.5.1 조지방	
산가		제9. 일반시험법 1.1.5.3.1 산가	
과산화물가		제9. 일반시험법 1.1.5.3.5 과산화물가	
환원당		제9. 일반시험법 1.1.4.1.2 환원당	
타르색소		제9. 일반시험법 2.4 착색료	
납		제9. 일반시험법 7.1 중금속 시험	
카드뮴		제9. 일반시험법 7.1 중금속 시험	
총수은		제9. 일반시험법 7.1 중금속 시험	
총비소		제9. 일반시험법 7.1 중금속 시험	
세균수		제9. 일반시험법 3.5 세균수	
대장균군		제9. 일반시험법 3.7 대장균군	
대장균		제9. 일반시험법 3.8 대장균	
살모넬라		제9. 일반시험법 3.11 살모넬라	
세균발육		제9. 일반시험법 3.6 세균발육시험	
테트라사이클린 클로르테트라사이클린		제9. 일반시험법 5.3.49 옥시테트라사이클린, 클로르테트라 사이클린, 테트라사이클린, 독시사이클린	
총 아플라톡신		제9. 일반시험법 6.1.1 아플라톡신(B ₁ , B ₂ , G ₁ 및 G ₂)	
포도당당량(DE)		제5. 식품별 기준 및 규격 6. 포도당 6) 시험방 법 (1) 포도당당량(D.E.)	
라피노스		제5. 식품별 기준 및 규격 10. 올리고당류 6) 시험방법 (1) 올리고당 ④ 갈락토올리고당 (라피노스, 스타치오스)	
열탕불용해잔사물	제5. 식품별 기준 및 규격 29. 기타식품류 29-25 한천 6) 시험방법 (5) 열탕불용해잔사물		
잔류용매 (초산에틸)	건강기능식 품의 기준 및 규격 (건강기능식 품공전)	제4. 건강기능식품 시험법 2, 2-5, 2-5-5 초산에틸	
잔류용매	식품첨가물의 기준 및 규격 (식품첨가물공전)	제4. 품목별 규격 및 기준 나. 천연첨가물 80. 파프리카추출색소	
잔류용매 (이소프로필알콜)		제4. 품목별 규격 및 기준 나. 천연첨가물 108. 글루코만난	

(출처, 식품공전)

다. 대장균군

대장균군은 Gram음성, 무아포성 간균으로서 유당을 분해하여 가스를 발생하는 모든 호기성 또는 통성 혐기성세균을 말한다. 대장균군 시험에는 대장균군의 유무를 검사하는 정성시험과 대장균군의 수를 산출하는 정량시험이 있다.

(1) 정성시험

(가) 유당배지법

유당배지를 이용한 대장균군의 정성시험은 추정시험, 확정시험, 완전시험의 3단계로 나눈다.

4.3 제조법에 따른 시험용액 10 mL를 2배 농도의 유당배지(배지 2)에, 시험용액 1 mL 및 0.1 mL를 유당배지(배지 2)에 각각 3개 이상씩 가한다.

① 추정시험

시험용액을 접종한 유당배지(배지 2)를 35~37°C에서 24±2시간 배양한 후 발효관내에 가스가 발생하면 추정시험 양성이다. 24±2시간 내에 가스가 발생하지 아니하였을 때에 배양을 계속하여 48±3시간까지 관찰한다. 이 때까지 가스가 발생하지 않았을 때에는 추정시험 음성이고 가스 발생이 있을 때에는 추정시험 양성이며 다음의 확정시험을 실시한다.

② 확정시험

추정시험에서 가스 발생한 유당배지발효관으로부터 BGLB 배지(배지 3)에 접종하여 35~37°C에서 24±2시간 동안 배양한 후 가스발생 여부를 확인하고 가스가 발생하지 아니하였을 때에는 배양을 계속하여 48±3시간까지 관찰한다. 가스발생을 보인 BGLB 배지(배지 3)로부터 Endo 한천배지(배지 5) 또는 EMB 한천배지(배지 6)에 분리 배양한다. 35~37°C에서 24±2시간 배양 후 전형적인 집락이 발생되면 확정시험 양성으로 한다. BGLB배지에서 35~37°C로 48±3시간 동안 배양하였을 때 배지의 색이 갈색으로 되었을 때에는 반드시 완전시험을 실시한다.

③ 완전시험

확정시험의 Endo 한천배지(배지 5)나 EMB한천배지(배지 6)에서 전형적인 집락 1개 또는 비전형적인 집락 2개 이상을 보통한천배지(배지 8)에 접종하여 35~37°C에서 24±2시간 동안 배양한다. 보통한천배지의 집락에 대하여 그람음성, 무아포성 간균이 증명되면 완전시험은 양성이며 대장균군 양성으로 판정한다.

(나) BGLB 배지법

4.3 제조법에 따른 시험용액 1 mL와 0.1 mL를 2개씩 BGLB 배지(배지 3)에 가한다. 대량의 시험용액을 가할 필요가 있을 때에는 대량의 배지를 넣은 발효관을 사용한다.

시험용액을 넣은 BGLB 배지(배지 3)을 35~37°C에서 48±3시간 배양한 후 가스 발생을 인정하였을 때에는(배지를 흔들 때 거품 모양의 가스의 존재를 인정하였을 때에도) Endo 한천배지(배지 5) 또는 EMB 한천배지(배지 6)에 분리 배양한다. 이하의 조작은 가. 유당배지법의 확정시험 또는 완전시험 때와 같이 행하여 대장균군의 유무를 확인한다.

(다) 데스옥시콜레이트 유당한천 배지법

4.3 제조법에 따른 시험용액 1 mL와 10배 단계 희석액 1 mL씩을 멸균 페트리접시 2매 이상씩에 무균적으로 취하고 약 43~45°C로 유지한 데스옥시콜레이트 유당한천배지(배지 9) 또는 VRBA 평판배지(배지 96) 약 15 mL를 무균적으로 분주하고 페트리접시 뚜껑에 부착하지 않도록 주의하면서 회전하여 검체와 배지를 잘 혼합한 후 응고 시킨다. 그리고 그 표면에 동일한 배지 또는 보통한천배지를 3~5 mL를 가하여 중첩시킨다. 이것을 35~37°C에서 24±2 시간 배양 한 후 전형적인 암적색의 집락을 인정하였을 때에는 1개 이상의 집락을, 의심스러운 집락일 경우에는 2개 이상을 Endo 한천배지(배지 5) 또는 EMB 한천배지(배지 6) 또는 MacConkey 배지(배지 30)에서 분리 배양한다. 이하의 조작은 가. 유당배지법의 확정시험 또는 완전시험 때와 같이 행하고 대장균군의 유무를 시험한다.

(2) 정량시험

(가) 최확수법

최확수란 이론상 가장 가능한 수치를 말하여 동일 희석배수의 시험용액을 배지에 접종하여 대장균군의 존재 여부를 시험하고 그 결과로부터 확률론적인 대장균군의 수치를 산출하여 이것을 최확수(MPN)로 표시하는 방법이다. 최확수는 연속한 3단계 이상의 희석시료(10, 1, 0.1 또는 1, 0.1, 0.01 또는 0.1, 0.01, 0.001)를 각각 5개씩(별표 1) 또는 3개씩(별표 2) 발효관에 가하여 배양 후 얻은 결과에 의하여 검체 1 mL중 또는 1 g중에 존재하는 대장균군수를 표시하는 것이다.

예로 검체 또는 희석검체의 각각의 발효관을 5개씩 사용하여 다음과 같은 결과를 얻었다면 최확수표에 의하여 시험검체 1 mL중의 MPN은 70으로 된다. 이 때 접종량이 1, 0.1, 0.01 mL일 때에는 70/10=7로 한다. 10, 1, 0.1 mL일 때에는 70/100=0.7로 한다.

시험용액 접종량	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	MPN
가스발생양성관수	5 개	2 개	1 개	70

시험용액 접종이 4단계 이상으로 행하여졌을 때에는 다음 표와 같이 취급한다.

예	가스발생 양성관수				유효숫자			
	1 mL	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL	1 mL	0.1 mL	0.01 mL	0.001 mL
I	5	5	2	0	-	5	2	0
II	5	4	3	0	5	4	3	-
III	0	1	0	0	0	1	0	-
IV	5	3	1	1	5	3	2	-

예 I, II : 5개 양성을 표시한 최소 접종량부터 시작한다.

예 III : 양성을 인정한 접종량을 중간으로 한다.

예 IV : 최소 유효 접종량 보다 1단계 적은 접종량에서 양성을 인정한 때에는 양성을 인정한 수를 최소유효 접종량의 양성관 수에 더한다(0.001 mL 단계의 양성관의 수를 0.01단계의 양성관의 수에 더함)

① 유당배지법

4.3 제조법에 따른 연속한 3단계 이상의 희석시료(10, 1, 0.1 또는 1, 0.1, 0.01 또는 0.1, 0.01, 0.001)를 5개 또는 3개씩의 유당배지(배지 2)에 접종한다. 단, 10 mL를 접종할 때에는 두배농도 유당 배지를 사용하고 0.1 mL 이하를 접종할 필요가 있을 때에는 10배 희석단계액을 각각 1 mL씩 사용한다. 가스발생 발효관 각각에 대하여 추정, 확정, 완전시험을 행하고 대장균군의 유무를 확인한 다음 최확수표로부터 검체 1 mL 또는 1 g중의 대장균군수를 구한다. 이때 시험용액을 가한 배지의 전부 또는 대부분에서 가스발생이 인정되거나 또 최소량을 가한 배지의 전부 또는 대부분이 가스가 발생되지 않도록 접종량과 희석도를 고려하여야 한다.

② BGLB배지법

4.3 제조법에 따른 연속한 3단계 이상의 희석시료(10, 1, 0.1 또는 1, 0.1, 0.01 또는 0.1, 0.01, 0.001)를 5개 또는 3개씩 BGLB 배지(배지 3)에 각각 접종한다. 단, 10 mL를 접종할 때에는 두배농도 BGLB 배지를 사용하고 0.1 mL 이하를 접종할 필요가 있을 때에는 10배 희석단계액을 각각 1 mL씩 사용한다. 이때 시험용액을 가한 배지의 전부 또는 대부분에서 가스발생이 인정되거나 또 최소량을 가한 배지의 전부 또는 대부분이 가스가 발생되지 않도록 접종량과 희석도를 고려하여야 한다. 이하의 조작은 각 발효관에 대하여 BGLB 배지에 의한 정성시험법에 따라 하고 대장균군의 유무를 확인한 다음 최확수표로부터 검체 1 mL 또는 1 g중의 대장균군수를 산출한다.

(나) 데스옥시콜레이트유당한천배지법

4.3 제조법에 따른 시험용액 1 mL와 각 10배 단계 희석액 1 mL에 대하여

이 배지에 의한 정성시험법과 같은 조작으로 35~37°C에서 24±2시간 배양한 후 생성된 집락중 전형적인 집락 또는 의심스러운 집락에 대하여 정성시험 때와 같은 조작으로 대장균군의 유무를 결정한다. 균수 산출은 4.5.1 일반세균수에 따라 한다.

(다) 건조필름법

4.3 제조법에 따른 시험용액 1 mL와 각 10배 단계 희석액 1 mL를 2매 이상씩 대장균군 건조필름배지 I(배지 54) 또는 대장균군 건조필름배지 II(배지 70)에 접종한 후, 35±1°C에서 24±2시간 배양한다. 대장균군 건조필름배지 I에서는 붉은 집락 중 주위에 기포를 형성한 집락수를 계산하고, 대장균군 건조필름배지 II에서는 청색 및 청녹색의 집락수를 계산하여 그 평균집락수에 희석배수를 곱하여 대장균군 수를 산출한다. 균수 산출 및 기재보고는 4.5.1 일반세균수에 따라 한다.

(라) 자동화된 최확수법(Automated MPN)

우유류, 유당분해우유, 가공유(무지유고형분 5.5%미만인 제품 제외), 발효우유, 가공치즈, 조제유류, 분유류, 건조저장육류, 식육추출가공품, 알가열제품 검사에 한한다.

4. 소재의 안정성실험

가. 연구 개요

EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) 수용액의 보관조건 및 ascorbic acid의 첨가 유무에 따른 안정성의 변화를 검토하였다. 이를 위하여 EGCG98 조제물을 0.1 % 농도로 물에 녹인 후 투명용기(RL) 및 갈색용기(RD)에 각각 4ml씩 분주하였다. 이들을 실온에서 각각 방치 후 EGCG98 함량변화를 HPLC 방법으로 측정하였으며 아울러 색의 변화를 관찰하였다.

또 조제물을 동일한 방법으로 수용액을 조제한 후 냉장고 (2° C) 안에서 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG98 함량변화를 동일한 HPLC 방법으로 측정하였으며 색의 변화를 관찰하였다 (CD).

한편, ‘EGCG고함유 녹차추출물’ (EGTE) (0.1 %)과 ascorbic acid (0.05 %)을 함께 섞어 녹인 후 실온에서 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG98함량변화를 HPLC 방법으로 측정하였으며 색의 변화를 관찰하였다 (VRL 및 VRD).

또 이와같이 조제한 EGCG98 + ascorbic acid 용액을 냉장고 (2° C) 안에서 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG98 함량변화를 동일한 HPLC 방법으로 측정하였다 (VCD).

나. 연구 방법

(1) 실험 검체의 조제

EGCG고함유 녹차추출물' (EGTE) 100 mg을 전자저울로 칭량하여 water 100 ml에 녹여서 농도 0.1 % 인 표준용액 1을 조제하였다. 표준용액 1을 각 투명용기(6 ml vial) 18개에 4 ml씩 분주하여서 실온-투명용기(RL) 시험에 사용할 검체를 조제하였고, 갈색용기(6 ml vial) 18개에 4 ml씩 분주하여 실온-갈색용기(RD) 시험에 사용할 검체를 조제하였다. 이와 같은 방법으로 냉장-갈색용기(CD) 시험에 사용할 검체를 조제하였다.

'EGCG고함유 녹차추출물' (EGTE) 100 mg과 ascorbic acid 50 mg을 각각 전자저울로 칭량하여 섞은 후 water 100 ml에 녹여 표준용액 2를 조제하였다. 표준용액 2를 각 투명용기(6 ml vial) 18개에 4 ml씩 분주하여서 실온-투명용기-ascorbic acid첨가(VRL) 시험에 사용할 검체를 조제하였고, 갈색용기(6 ml vial) 18개에 4 ml씩 분주하여 실온-갈색용기-ascorbic acid첨가(VRD) 시험에 사용할 검체를 조제하였다. 이와 같은 방법으로 냉장-갈색용기-ascorbic acid첨가(VCD) 시험에 사용할 검체를 조제하였다.

(2) 실온-투명용기 (RL) 보관 51주 안정성

투명용기에 분주한 'EGCG고함유 녹차추출물' (EGTE) 수용액을 실온에 방치 하였다. 이들을 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주방치 후 EGCG 함량변화를 HPLC 방법으로 측정하였으며 색의 변화를 함께 관찰하였다. 각 실험군은 duplicate 로 실시하여, 평균치를 산출하였다.

(3) 실온-갈색용기 (RD) 보관 51주 안정성

갈색용기에 분주한 'EGCG고함유 녹차추출물' (EGTE) 수용액을 실온에 방치 하였다. 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG 함량변화를 HPLC 방법으로 측정하였으며 색의 변화를 함께 관찰하였다. 각 실험군은 duplicate 로 실시하여, 평균치를 산출하였다.

(4) 실온-투명용기 ascorbic acid 첨가(VRL) 51주 보관 안정성

투명용기에 분주한 ascorbic acid를 첨가한 'EGCG고함유 녹차추출물' (EGTE) 수용액을 실온에 방치 하였다. 각각 0일, 1일, 3일, 4일,

1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG98 함량변화를 HPLC 방법으로 측정하였으며 색의 변화를 함께 관찰하였다. 각 실험군은 duplicate 로 실시하여, 평균치를 산출하였다.

(5) 실온-갈색용기 ascorbic acid 첨가(VRD) 51주 보관 안정성

갈색용기에 분주한 ascorbic acid를 첨가한 ‘EGCG고함유 녹차추출물’ (EGTE) 수용액을 실온에 방치 하였다. 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG98 함량변화를 HPLC 방법으로 측정하였으며 색의 변화를 함께 관찰하였다. 각 실험군은 duplicate 로 실시하여, 평균치를 산출하였다.

(6) 냉장-갈색용기(CD) 51주 보관 안정성

갈색용기에 분주한 ‘EGCG고함유 녹차추출물’ (EGTE) 수용액을 냉장실에 방치 하였다. 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG 함량변화를 HPLC 방법으로 측정하였으며 색의 변화를 함께 관찰하였다. 각 실험군은 duplicate 로 실시하여, 평균치를 산출하였다.

(7) 냉장-갈색용기-ascorbic acid 첨가(VCD) 51주 보관 안정성

갈색용기에 분주한 ascorbic acid를 첨가한 ‘EGCG고함유 녹차추출물’ (EGTE) 수용액을 냉장실에 방치 하였다. 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG 함량변화를 HPLC 방법으로 측정하였으며 색의 변화를 함께 관찰하였다. 각 실험군은 duplicate 로 실시하여, 평균치를 산출하였다.

다. 연구결과 및 고찰

(1) 실온-투명용기 (RL)

투명용기에 분주한 ‘EGCG고함유 녹차추출물’ (EGTE) 수용액을 실온에 방치 하였다. 이들을 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG의 함량을 HPLC 방법으로 측정하였으며 수용액의 색변화도 함께 관찰하였다.

EGCG의 함량은 peak area 값을 기준으로 산출하였다. 실온-투명용기에 보관한 실험군(RL)의 경우, 실험 1일차부터 4일차까지 점진적으로 EGCG 함량이 감소하였으며 4일차에는 EGCG함량이 실험개시일 (0 일)에 관찰된 함량에 비하여 70 % 수준으로 떨어졌다. 이후 EGCG의 함량은 계속적으로 감소하여, 실험종료 시점(51주)에서의 EGCG함량은 실험개시 첫날의 함량에 비하여 32 %로 감소하였다. (Table 5, Fig 7)

수용액의 색변화는 1 주일이 지난 시점부터 갈변이 시작되어 4 주 이후에는 갈변정도를 육안으로도 쉽게 판별할 수 있었다. (Fig 15)

Table 5.

	RL1-1	RL1-2	MEAN	RL
2017-08-21 (0일)	7661	7238	7450	100
2017-08-22 (1일)	5807	5867	5837	78
2017-08-24 (3일)	6400	5263	5832	78
2017-08-25 (4일)	5519	5048	5284	74
2017-08-28 (1주)	5604	5378	5491	71
2017-09-05 (2주)	4982	5002	4992	67
2017-09-11 (3주)	4310	4093	4202	56
2017-09-18 (4주)	3190	3867	3529	47
2017-11-03(10주)	2810	3015	2913	39
2018-04-05(32주)	3005	2062	2531	37
2018-05-15(38주)	3441	2071	2756	36
2018-06-15(42주)	2790	2270	2530	34
2018-07-26(48주)	2804	2714	2759	33
2018-08-16(51주)	2913	2301	2607	32

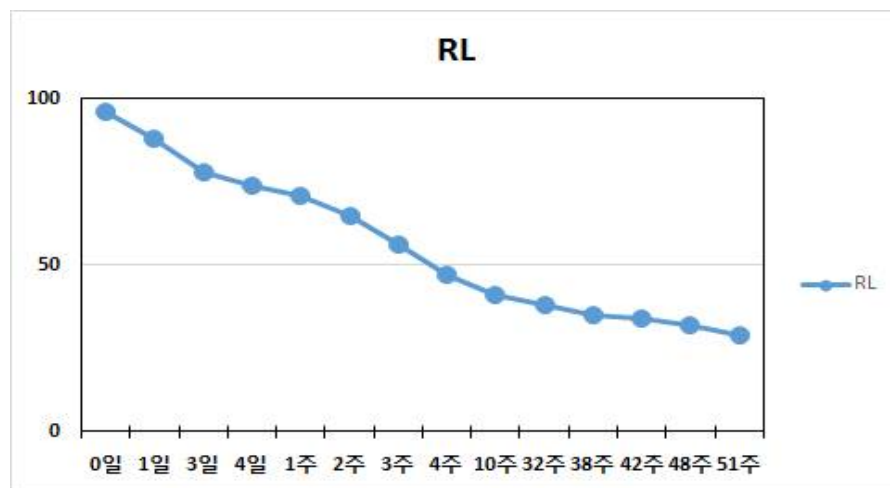


Fig 7. Change of EGCG content in ‘EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) solution stored in transparent vessel at room temperature

(2) 실온-갈색용기 (RD)

갈색용기에 분주한 ‘EGCG고함유 녹차추출물’ (EGTE) 수용액을 실온에 방치 하였다. 이들을 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG의 함량을 HPLC 방법으로 측정하였으며 수용액의 색변화도 함께 관찰하였다.

EGCG의 함량은 peak area 값을 기준으로 산출하였다. 실온-갈색용기에 보관한 실험군(RD)의 경우, 실험 1일차부터 4일차까지 점진적으로 EGCG 함량이 감소하였으며 1 주차에는 실험개시일에 관찰된 EGCG함량의 76 % 수준으로 떨어졌다. 이후 EGCG의 함량은 계속적으로 감소하여, 실험종료 시점(51주)에서의 EGCG함량은 실험개시 첫날의 함량에 비하여 25%로 감소하였다. (Table 6 및 Fig 8)

Table 6.

	RD1-1	RD1-2	MEAN	RD
2017-08-21 (0일)	7661	7238	7450	100
2017-08-22 (1일)	6452	6060	6256	84
2017-08-24 (3일)	6224	5854	6039	81
2017-08-25 (4일)	5793	5381	5587	76
2017-08-28 (1주)	5840	5410	5625	75
2017-09-05 (2주)	5014	4991	5003	67
2017-09-11 (3주)	3104	3189	3147	42
2017-09-18 (4주)	2284	3041	2663	36
2017-11-03(10주)	2521	1949	2235	30
2018-04-05(32주)	2423	2138	2281	31
2018-05-15(38주)	2246	2616	2431	33
2018-06-15(42주)	2597	2379	2488	33
2018-07-26(48주)	1679	1795	1737	30
2018-08-16(51주)	1947	1779	1863	28

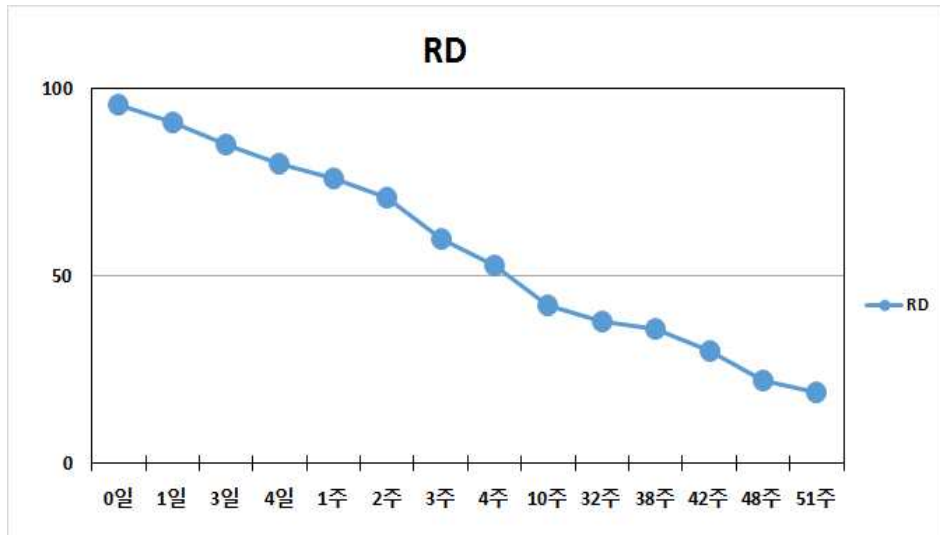


Fig 8. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) solution stored in brown colored vessel at room temperature

(3) 실온-투명용기 ascorbic acid 첨가(VRL)

EGCG고함유 녹차추출물(EGTE)에 ascorbic acid를 2:1비율로 첨가한 후 물에 녹인 수용액을 실온에 방치 하였다. 이들을 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG의 함량을 HPLC 방법으로 측정하였으며 수용액의 색변화도 함께 관찰하였다. EGCG의 함량은 peak area 값을 기준으로 산출하였다. 실온-투명용기 ascorbic acid첨가해 보관한 실험군(VRL)의 경우, 실험 1일차부터 4일차까지 점진적으로 EGCG 함량이 감소하였으며 4일차에는 실험개시일에 관찰된 EGCG함량의 82 % 수준으로 떨어졌지만 ascorbic acid를 첨가하지 않은 실험군의 EGCG함량의 감소율에 비해서는 미미한 수준이었다. 이후 EGCG의 함량은 계속적으로 감소하여, 실험종료 시점(51주)에서의 EGCG함량은 실험개시 첫날의 함량에 비하여 38%로 감소하였다. 수용액의 색변화는 1주일이 지난 시점부터 갈변이 시작되어 4주 이후에는 갈변정도를 육안으로도 쉽게 관별할 수 있었다. (Table 7, Fig 7, Fig 11)

Table 7.

	VRL1-1	VRL1-2	MEAN	VRL
2017-08-21 (0일)	8104	8133	8119	100
2017-08-22 (1일)	7420	7445	7433	92
2017-08-24 (3일)	6785	6786	6786	84
2017-08-25 (4일)	6608	6646	6627	82
2017-08-28 (1주)	6162	6726	6444	79
2017-09-05 (2주)	5342	6248	5795	71
2017-09-11 (3주)	4882	5201	5042	62
2017-09-18 (4주)	4902	4998	4950	61
2017-11-03(10주)	4361	3759	4060	51
2018-04-05(32주)	4070	4210	4140	50
2018-05-15(38주)	4621	4323	4472	44
2018-06-15(42주)	3871	2947	3409	42
2018-07-26(48주)	3102	3520	3311	41
2018-08-16(51주)	2918	3252	3085	38

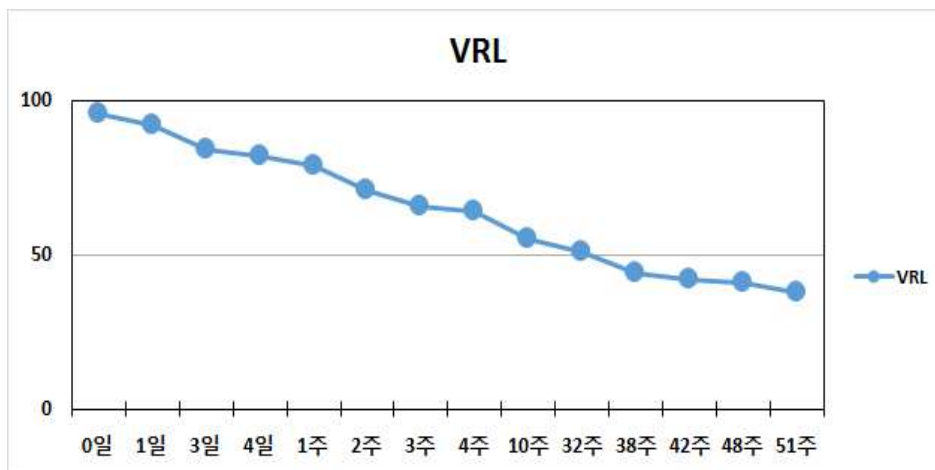


Fig 9. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) solution with ascorbic acid stored in transparent vessel at room temperature

(4) 실온-갈색용기 ascorbic acid 첨가(VRD)

EGCG고함유 녹차추출물' 에 ascorbic acid를 2:1비율로 첨가한 후 물에 녹인 수용액을 갈색용기에 분주하여 실온에 방치 하였다. 이들을 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG의 함량을 HPLC 방법으로 측정하였다. EGCG98의 함량은 peak area 값을 기준으로 산출하였다. 실온-갈색용기 ascorbic acid첨가해 보관한 실험군(VRD)의 경우, 실험 일주일차에 EGCG의 함량이 84%로 감소하였고 2주차부터 점진적으로 EGCG 함량이 감소하였다. 이후 EGCG의 함량은 계속적으로 감소하여, 실험종료 시점(51주)에서의 EGCG함량은 실험개시 첫날의 함량에 비하여 44%로 감소하였지만, ascorbic acid를 첨가하지 않은 수용액의 EGCG함량의 감소율에 비해 현저히 더디게 나타났다. (Table 8, Fig 8, Fig 11)

Table 8.

	VRD1-1	VRD1-2	MEAN	VRD
2017-08-21 (0일)	8104	8133	8119	100
2017-08-22 (1일)	7396	7431	7414	91
2017-08-24 (3일)	7285	7389	7337	90
2017-08-25 (4일)	6998	6657	6828	86
2017-08-28 (1주)	6920	6724	6822	84
2017-09-05 (2주)	6190	6267	6229	77
2017-09-11 (3주)	5780	5804	5792	71
2017-09-18 (4주)	5168	4802	4985	61
2017-11-03(10주)	4372	4234	4303	54
2018-04-05(32주)	4758	4012	4385	53
2018-05-15(38주)	4471	3969	4221	52
2018-06-15(42주)	3780	3698	3739	46
2018-07-26(48주)	3708	3547	3628	46
2018-08-16(51주)	3766	3714	3740	44

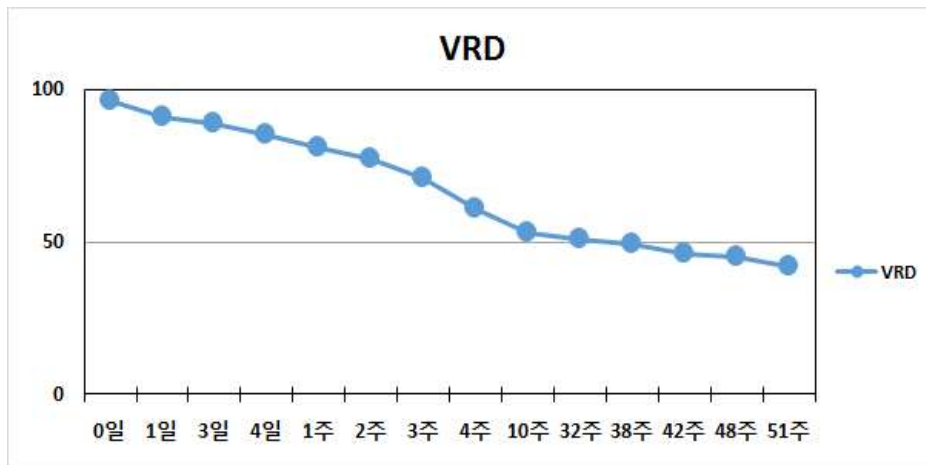


Fig 10. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) solution with ascorbic acid stored in brown colored vessel at room temperature.

(5) 냉장-갈색용기(CD)

갈색용기에 분주한 ‘EGCG고함유 녹차추출물’ 수용액을 냉장고에 방치 하였다. 이들을

각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG의 함량을 HPLC방법으로 측정하였다.

EGCG의 함량은 peak area 값을 기준으로 산출하였다. 냉장고 속에서 갈색 용기 내에 보관한 실험군(CD)의 경우, 실험 4주차까지도 EGCG의 함량이 85%까지 유지되었으며, 이후 점진적으로 EGCG 함량이 감소하였으나 51주차에도 실험개시일에 관찰된 EGCG함량의 61% 수준으로 유지되었다.

(Table 9, Fig 9, Fig 11)

Table 9.

	CD1-1	CD1-2	MEAN	CD
2017-08-21 (0일)	7238	7661	7450	100
2017-08-22 (1일)	7729	6941	7335	98
2017-08-24 (3일)	6909	7039	6974	95
2017-08-25 (4일)	7352	6865	7109	95
2017-08-28 (1주)	7218	7010	7114	94
2017-09-05 (2주)	6983	6772	6878	92
2017-09-11 (3주)	6855	6166	6511	87
2017-09-18 (4주)	6508	6203	6356	85
2017-11-03(10주)	5485	5146	5316	72
2018-04-05(32주)	5442	5199	5321	72
2018-05-15(38주)	5233	5431	5332	71
2018-06-15(42주)	5183	5132	5158	69
2018-07-26(48주)	4578	4786	4682	63
2018-08-16(51주)	4477	4613	4545	61

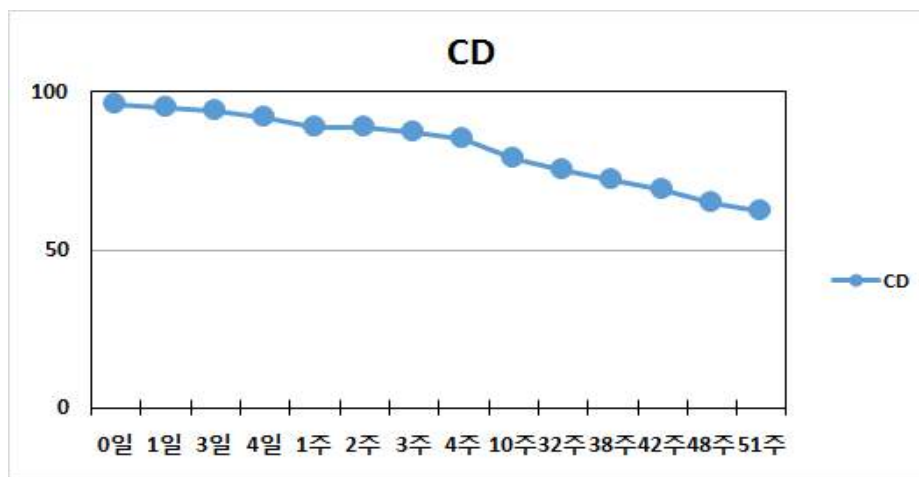


Fig 11. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) solution stored in brown colored vessel at 2°C.

(6) 냉장-갈색용기-ascorbic acid 첨가(VCD)

EGCG고함유 녹차추출물에 ascorbic acid를 2:1비율로 첨가한 후 물에 녹인 수용액을 갈색용기에 분주하여 냉장고에 방치 하였다. 이들

을 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG의 함량을 HPLC 방법으로 측정하였다. EGCG98의 함량은 peak area 값을 기준으로 산출하였다. ascorbic acid첨가한 검체를 냉장고 속에서 보관한 실험군(VCD)의 경우, 실험 4주차까지도 EGCG의 함량이 71%까지 유지되었으며, 이후 점진적으로 EGCG 함량이 감소하였으나 51주차에도 실험개시일에 관찰된 EGCG함량의 51 % 수준으로 유지되었다. (Table 10, Fig 10, Fig 11)

Table 10.

	VCD1-1	VCD1-2	MEAN	VCD
2017-08-21 (0일)	8133	8104	8119	100
2017-08-22 (1일)	7511	7977	7744	95
2017-08-24 (3일)	7549	7015	7282	91
2017-08-25 (4일)	7305	7378	7342	90
2017-08-28 (1주)	6709	7084	6897	85
2017-09-05 (2주)	6302	6821	6562	81
2017-09-11 (3주)	6160	6246	6203	76
2017-09-18 (4주)	6279	5302	5791	71
2017-11-03(10주)	5405	5637	5521	69
2018-04-05(32주)	5315	5889	5602	67
2018-05-15(38주)	5051	5341	5196	64
2018-06-15(42주)	4911	5157	5034	62
2018-07-26(48주)	4176	4464	4320	53
2018-08-16(51주)	4291	3989	4140	51

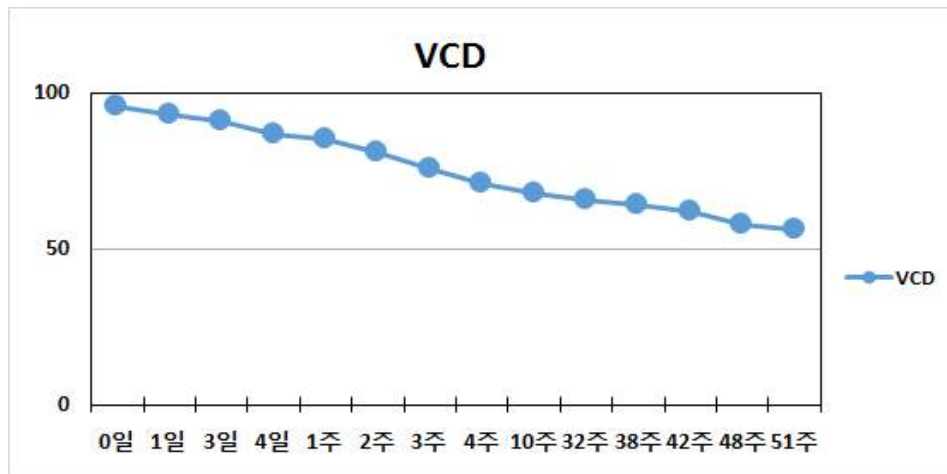


Fig 12. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) with ascorbic acid stored in brown colored vessel at at 2°C.

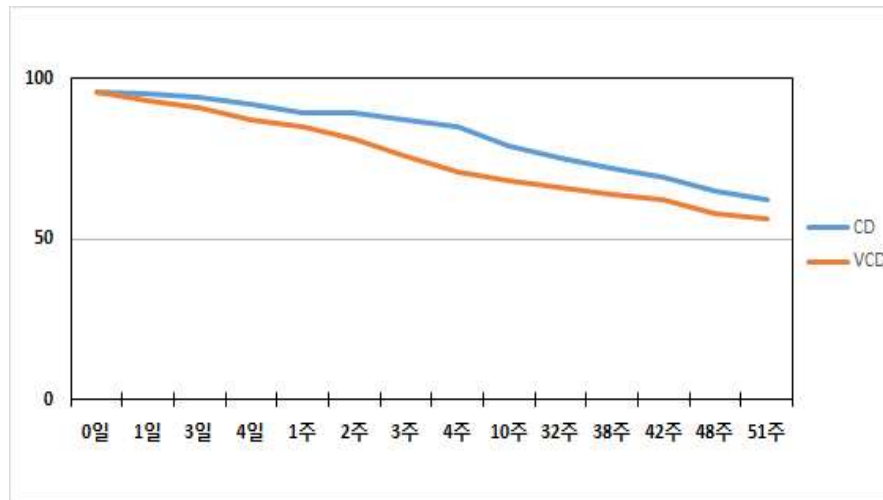


Fig 13. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물 (EGTE) with ascorbic acid and without ascorbic acid stored in brown colored vessel at 2°C.

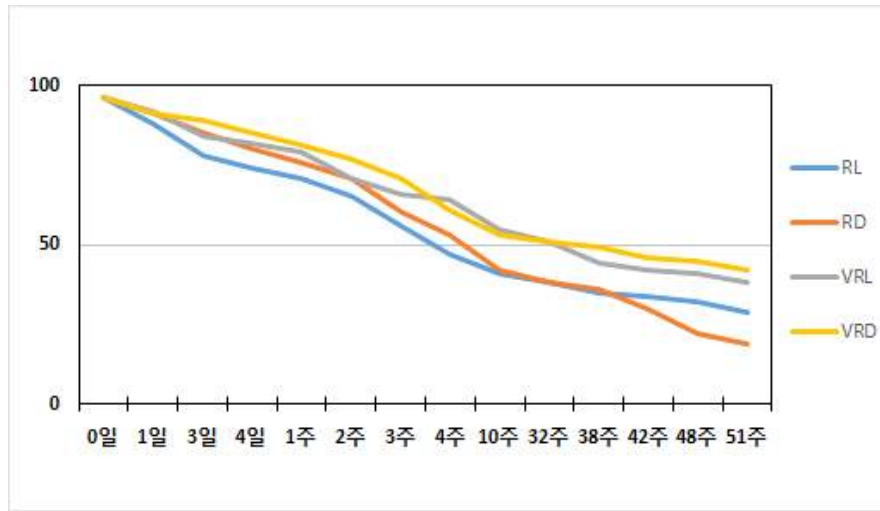


Fig 14. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물 (EGTE) in various storage condition at room temperature.

	기간												
경과 일	1일	3일	4일	7일	2주	3주	4주	10주	32주	38주	42주	48주	51주
분석 일자	8/22	8/24	8/25	8/28	9/05	9/11	9/18	11/03	4/05	5/15	6/15	7/26	8/16
①-1 상온(20~22°C)- Light 4mg/4 mL													
②-1 상온(20~22°C)- Dark 4mg/4 mL													
③-1 상온(20~22°C)- Light Vta.c+ EGCG 4mg/4 mL													
④-1 상온(20~22°C)- Dark Vta.c+ EGCG 4mg/4 mL													

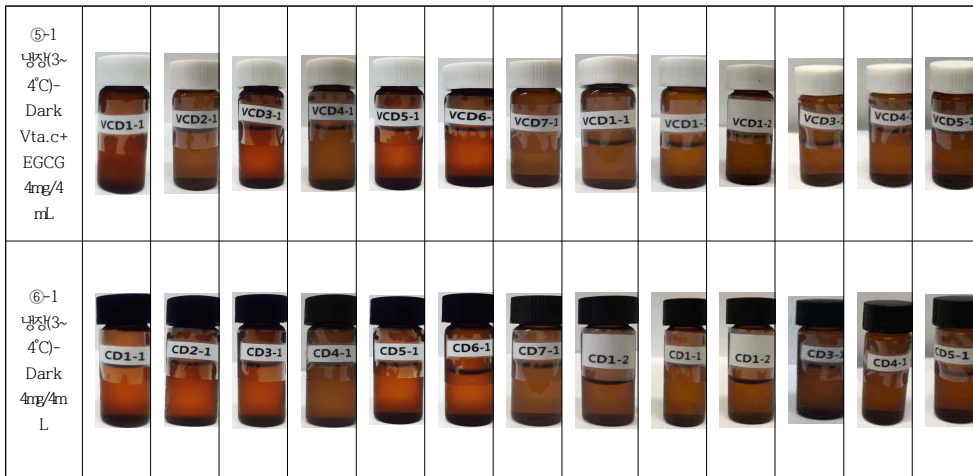


Fig 15. EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) 수용액의 온도별, 빛/어둠별 보관상 농도별 색도변화 평가(51주)

라. 결론

추출 및 가공과정 중 유기용매를 사용하지 않고 물과 주정만을 사용하는 간편 chromatography 방법에 따라 녹차추출물을 정제하여 caffeine은 전혀 함유되지 아니하고 녹차의 대표 카테킨 성분으로 알려진 EGCG(epigallocatechin gallate) 성분이 97% 이상으로 함유된 EGCG 고함유 녹차추출물’ (EGTE : epigallocatechin gallate-rich green tea extract)을 개발하였으며 이를 소재로 활용하여 다양한 건강기능식품의 개발을 시도하였다. 이를 위하여 우선 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’을 서로 다른 실험조건(온도, 차광유무 등)에 1년에 걸쳐 노출시킨 후 색도의 변화 및 EGCG의 함량을 지표로 하여 안정성의 변화를 조사분석하였다.

우선 투명용기 및 갈색용기에 담은 후 각각 실온, 냉장 및 냉동조건에서 보관한 분말상 시료의 경우 HPLC 분석법에 따라 각 해당실험일에 EGCG의 함량을 측정된 결과 실험개시 1년이 경과한 시점에서 EGCG의 함량변화가 관찰되지 않았으며 이러한 결과는 모든 보관조건에서 동일하게 관찰되었다. (Fig 3)

한편 수용액상 시료를 대상으로 한 실험군에서는 각각의 보관조건에 따라 안정성의 변화가 큰 차이를 보여주었다. 투명용기에 담은 후 실온에 보관한 RL군의 경우 실험개시 후 색도가 서서히 진해지기 시작하였으며 3주 경과시점부터는 육안으로도 쉽게 갈변현상을 관찰할 수 있었다 (Fig 3). 또 EGCG의 함량도 서서히 감소하여 3주 경과시에는 50% 이하로 감소되었으며 실험개시후 1년 경과시점에서는 초기 EGCG의 함량의 30% 정도만 유지되고 있음을 관찰하였다. (Fig 4)

또, 갈색용기에 담은 후 실온에 보관한 RD군의 경우에도 3주 경과시 EGCG의 함량이 50% 수준으로 감소되었으며 RL군의 경우와 마찬가지로 실험개시 후 1년 경과시점에서는 초기 EGCG의 함량의 30% 미만 정도만 유지되고 있어 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’ 수용액을 실온에서 보관할 경우 용기의 차광여부에 따른 안정성의 변화는 미미한 수준이라고 판단할 수 있었다. 그러나 갈색용기에 분주 후 냉장보관한 CD군의 경우에는 EGCG의 함량감소가 서서히 진행되었으며 실험개시후 1년 경과시점에도 초기 EGCG의 함량의 70% 이상의 수준을 유지하고 있어 보관온도조건이 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’ 수용액의 안정성 유지에 보다 큰 영향을 미치고 있음을 알 수 있었다. 한편 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’ 수용액의 안정성을 높여줄 목적으로 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’ 수용액에 vitamin C를 추가한 후 동일한 실험조건에서 보관한 VRL, VRD 및 VCD군의 경우 vitamin C를 추가하지 아니하고 동일한 실험조건에서 보관한 RL, RD 및 CD군과 상호비교하여 볼 때 VRL군의 경우 RL군에 비하여 색도의 변화가 비교적 서서히 진행됨이 관찰되었다 (Fig 3). EGCG의 함량 역시 VRL군이 RL군에 비하여 서서히 감소되고 있음이 관찰되었고 특히 RD군에 비하여 VRD군은 EGCG의 함량감소가 유의적으로 지연됨을 관찰할 수 있었다. 그러나 갈색용기에 분주 후 냉장보관한 CD군과 VCD군의 경우에는 두 군 간의 EGCG 함량감소에 있어서 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다. 따라서 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’ 수용액에 vitamin C를 추가하여 보관할 경우 실온 보관조건에서는 안정성이 어느 정도 향상되었음이 관찰되었지만 그 효과는 미미한 수준이라 사료된다. 또 냉장보관(CD군과 VCD군)의 경우에 있어서는 vitamin C의 추가에 따른 안정성의 향상효과는 관찰되지 아니하였다. (Fig 5)

이와 같은 연구결과를 종합하여 볼때 신규건강기능식품소재 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’ (EGTE)은 액상제제로 개발될 경우 비록 냉장보관 시에는 1년 후에도 70% 이상으로 유효성분이 유지될 수는 있으나 제품의 생산, 유통, 보관과정 중에 더 많은 함량손실이 예측되고 있어 상업적 제품에는 적합한 제형이 될 수 없으리라 예측된다. 따라서 본 소재 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’ (EGTE)은 보관 중에 함량손실이 쉽게 발생될 수 있는 액상제제보다는 보다 우수한 안정성을 보여주는 캡슐제, 정제, 스틱제 등 분말상의 제형으로 개발되어야 하리라 사료된다.

제2절 EGCG 고함유 녹차소재의 규격화

1. 카테킨 총량 분석결과
2. EGCG 함량분석 결과
3. 카페인(함량) 분석결과
4. 잔류용매(함량) 분석결과
5. 대장균(함유) 분석결과

공인기관인 기능성식품연구원에 의뢰하여 분석한 이상의 시험성적서를 아래에 첨부 합니다.

제 D2019120784 호 문서화인 7Q5M-2R9F-8X98		시험·검사성적서																			
제품명	CGTE(원료제품)	제조일자 (유통기한)	2019-11-20																		
의뢰인	업체명	(주)알앤오식품	성명																		
	주소	전라북도 전주시 덕진구 원광동길 111-18, 101호 (장동, 전북생물산업진흥원 바이오식품산업과학센터)																			
제조번호		검수년월일	2019-12-09																		
검사의뢰목적	참고용	검수번호	D2019120784																		
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-12-19 시험·검사 책임자 : 이현영, 장정순 검사관련 총 책임자 : 김진희</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; margin: 10px 0;"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사결과</th> <th>시험·검사원</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>카테킨(mg/g)</td> <td>994.42mg/g</td> <td>장혜진</td> </tr> <tr> <td>에피갈로카테킨갈레리트(mg/g)</td> <td>982.40mg/g</td> <td>장혜진</td> </tr> <tr> <td>카페인(mg/kg)</td> <td>8.46mg/kg</td> <td>송지은</td> </tr> <tr> <td>대장균</td> <td>음성</td> <td>엄희숙</td> </tr> <tr> <td>초산에틸 잔류용매(mg/kg)</td> <td>불검출</td> <td>김진희</td> </tr> </tbody> </table> <p>분석법-[카테킨-카페인]-건강기능식품공전/녹차추출물 분석법-[초산에틸]-건강기능식품공전</p> <p style="font-size: small; margin-top: 20px;">※ 위 결과는 의뢰된 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 제원에 무충한 경우 시험·검사 및 결과안은 별지로 작성 가능합니다. ※ 분석작시는 참고용 실적서입니다. 시험·검사결과에 시험·검세부위 여자의 필요 및 용도 등에 이용될 수 있으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 활용될 수 없습니다.</p> <p style="text-align: center;">2019년 12월 19일</p> <p style="text-align: center;">한국기능식품연구원 </p> <p style="font-size: x-small; text-align: center;">(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.kbsi.re.kr 전화번호 031-922-2900 FAX 031-9228-0200-1</p>				시험·검사항목	시험·검사결과	시험·검사원	카테킨(mg/g)	994.42mg/g	장혜진	에피갈로카테킨갈레리트(mg/g)	982.40mg/g	장혜진	카페인(mg/kg)	8.46mg/kg	송지은	대장균	음성	엄희숙	초산에틸 잔류용매(mg/kg)	불검출	김진희
시험·검사항목	시험·검사결과	시험·검사원																			
카테킨(mg/g)	994.42mg/g	장혜진																			
에피갈로카테킨갈레리트(mg/g)	982.40mg/g	장혜진																			
카페인(mg/kg)	8.46mg/kg	송지은																			
대장균	음성	엄희숙																			
초산에틸 잔류용매(mg/kg)	불검출	김진희																			



제3절 EGCG 고함유 녹차소재의 제조공정 최적화

1. 연구 목적

고순도 EGCG 소재를 양산하기 위한 공정 최적화를 모색하여 공정단계별 생산수율을 제고하며 제조원가를 절감할 수 있는 방법을 제시코자 한다.

2. 실험방법 및 결과

가. 실험재료

- 녹차건엽(보성녹차)
- 녹차건엽 100kg
- 외관 및 색상: 연녹색의 절세분
- 보관조건: 분말 냉소

나. 실험방법

제조공정 4단계의 각 과정마다 최적 조건의 탐색을 위한 반복 실험을 통하여 수율 제고, 원가 절감, 기간 단축 등의 효율 상승 방안을 검토한다.

- (가) 용매분배 과정의 개선점: 대량생산 시 EA와 물 사이에 중간층이 형성되는 상황에서 EGCG가 보다 많이 상층(EA)에 분배될 수 있는 방안을 개발한다.
- (나) Diaion HP-20 크로마토그래피 과정의 개선점: 용출액 조성 변화를 통해 카페인 제거의 보다 고효율 방법 제시 및 폐용매량을 줄일 수 있는 방안을 제시한다.
- (다) 재결정법의 효율 제고 및 최적 동결건조법 제시: 반복 재결정화 하여 수율을 높여 가고, 또한 선도물질 EGCG분말을 어느 시점에 첨가해야 재결정화 기간(시간)을 단축할 수 있는지를 제시한다.
- (라) 동결건조의 건조온도 control program 개발

다. 실험결과

- (가) 용매분배 공정과정의 최적 조건 검토

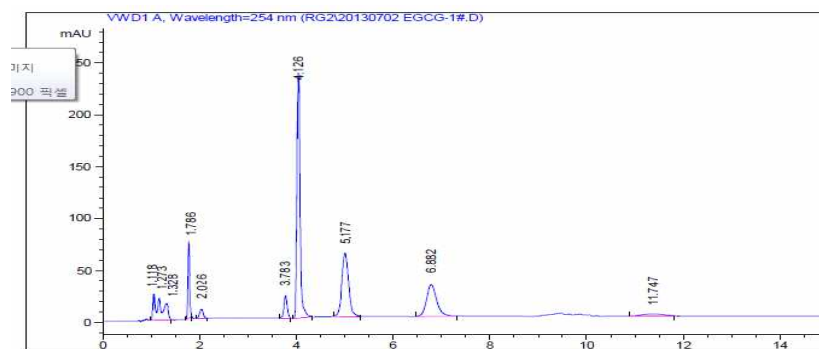
문제점: 실험실-scale 단위과정에서는 그렇지 않으나 양산 시에는 용매분배 분리능이 현저히 낮아진다.

- ① Trail 1: 용매량을 늘림(30 브릭기스 추출물 10L 당 EA용매를 1.0배, 1.5배, 2.0배 비율)으로 분배 시도한다.

- ② Trial 2: 30분간 반응기 회전 후 정지시간을 늘림(1박)
- ③ Trial 3: 중간층이 형성되기 때문에 소금물 첨가
- ④ Trial 4: 여전히 중간층이 남아 있어서 반응기 온도를 40°C까지 상승 하면서 회전 후 방치한다.

해결책: 상기에서와 같이 소금물 첨가, 온도 상승하면서 반응기를 1박 방치하면 충분히 층이 갈라지며 이를 3회 반복하여 용매분배를 마무리한다.

용매분배 방법 개선 후 EA층의 HPLC분석 결과



즉, 추출물에 함유 되어 있던 EGCG의 량이, 용매분배 시 물층으로 분배되는 손실 없이, 거의 EA층으로 회수된 것으로 판단된다(EGCG 순도는 대략 65%).

(나) 분리정제 크로마토그래피 공정 과정의 최적조건 검토

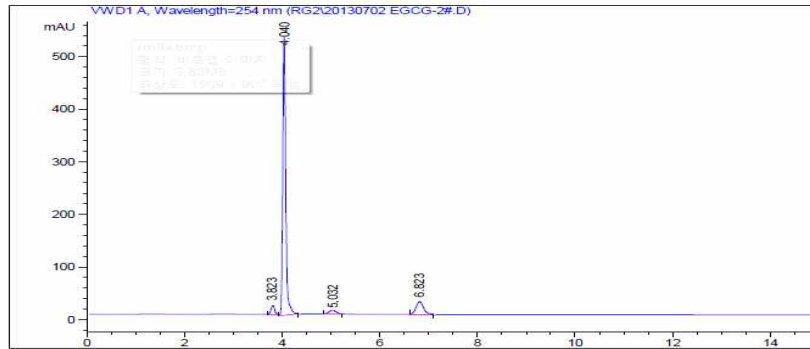
문제점: 이 과정에서 카페인을 제거하기 위하여 20% EtOH를 사용하게 되는데 EGCG를 최대한 씻어내기 위하여 충분한 용출액을 사용하다보니 농축액이 증가하여 원가상승 요인이 됨. 또한 20% EtOH 용출액의 농축을 용이하게 하기 위하여 EA로 용매분배하게 되는데 일부 EA가 물층에 포함됨으로 해서 폐수로 버리지 못하고 환경 오염 우려상 폐액으로 처리하다보니 처리 비용 증가를 감수해야 한다.

- ① Trial 1: EGCG를 최대한 확보하기 위해서는 20%에서 25%로 조성을 바꿔 용출을 시도를 권함. 반면 그럴 경우 카페인이 함께 용출될 수 있으나 컬럼에 시료 로딩 시 따뜻한 물에 녹여 하되 바로 용출을 시도하지 말고 이 용액이 충진제에 스며들은 후 온도가 내려가기를 기다렸다가 용출을 하게 되면 카페인은 충진제 상단부에 고정화 되어 25% EtOH로 씻어도 용출되지 않기 때문에 이 문제를 해결할 수 있다.
- ② Trial 2: 양산 시 발생하게 될 대량의 물층을 별도 농축반응기에서 농축하여 EA를 충분히 분별한 다음 나머지 물층만을 폐수 처리하는 방

법을 권한다.

해결책: 상기에서와 같은 방법으로 Diaion HP-20 충전제 컬럼에서 25% EtOH로 처리하여 카페인을 제거함. 또한 폐수 처리를 위해 2톤 급 농축반응기를 확보하였다.

Diaion HP-20 크로마토그래피 방법 개선 후 HPLC분석 결과



정량분석결과, 추출물에 함유 되어 있던 EGCG의 양이, 카페인 분획 물에 남아있지 않고 거의 25% EtOH 분획물에 회수된 것으로 판단됨 (EGCG 순도가 80%에 육박함). 물층에 분배되었던 일부 EGCG를 회수함으로써 본 공정단계의 수율이 12% 상승되는 효과가 있다.

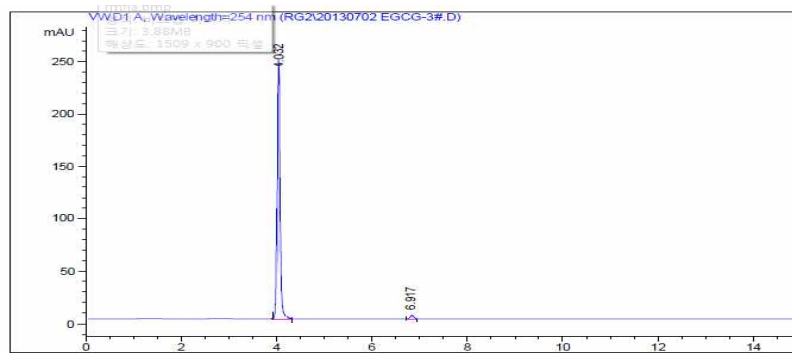
(다) 재결정화 공정 과정의 최적조건 검토

문제점: 재결정화는 수율이 낮다는 것과 장시간을 요한다는 점이 단점임. 경쟁사 소재는 순도가 94%이면서 약간 분홍빛을 띠는데 반해 본 소재는 재결정을 반복함으로써 완전 백색 분말로 얻어진다.

- ① Trial 1: 재결정 수율을 높이기 위하여 상등액을 반복적으로 재결정함으로써 회수율을 높일 수 있으며 결국 수율이 상승한다.
- ② Trial 2: 재결정 1 cycle이 1주정도 걸리는데 재결정화 기간을 단축시키기 위하여 저온에 보관한지 1박 후 결정화 leading 시료로 EGCG분말을 풀어주면 재결정화가 빨라진다.
- ③ Trial 3: 동결건조 시 가능한 한 낮은 온도에서 작동함으로써 갈변현상이 나타나지 않도록 한다.

해결책: 상기와 같이 재결정화를 반복한다.

정량분석결과, 추출물에 함유 되어 있던 EGCG는 3회 반복 재결정화 하면 약 80% 회수되는 것으로 판단된다.(수율 EGCG 순도는 97~98%).



본 재결정화 단계의 수율을 높이기 위해서는 추가 재결정화를 추천하지만 비용 증가 및 시간 단축 차원에서 고려되어야 할 것임. 3회 반복 시 3주 소요된다.

제4절 녹차소재의 탈카페인화 공정 개선 연구

1. 개요

앞에서 추출 및 가공과정 중 유기용매를 사용하지 않고 물과 주정(spirit, ethanol)만을 사용한 간편 chromatography 방법에 따라 녹차 열수추출물을 정제한 결과 caffeine은 전혀 함유되지 아니하고 대표적인 차카테킨 성분으로 알려진 EGCG (epigallocatechin gallate)만 98% 이상 함유된 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’ (GTE : epigallocatechin gallate-rich green tea extract)을 고수율로 확보할 수 있는 제조공법을 개발하여 보고한 바 있다.

본 제조공법에 따라 실험실 수준 (lab-scale) 혹은 시험생산 수준 (pilot-scale)의 생산설비를 활용하여 녹차 수십 kg을 추출하여 최종제품인 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’ (GTE)를 생산하여 왔으며 이 경우에는 별다른 무리없이 본 제조공법의 프로토콜에 따라 제품의 대량생산을 위하여 녹차 수백 kg - ton을 대형 탱크형 추출조 내에서 추출하고 대형 chromatography 설비들을 사용하여 최종제품을 생산하고자 시도한 결과 예기치 못한 못한 문제점이 속속 발생하였고 이러한 문제점들을 해결하고자 본 제조공정을 일부 개선할 필요가 야기되었다. 대량생산 system에 본 제조공정을 적용 시 발생한 문제점으로 우선 추출에 필요한 최소량의 물을 사용하여 대형 추출조 내에서 60 ~ 80 °C에서 추출할 경우 EGCG의 상당량이 GCG로 전환되었으며 전환된 GCG는 본 제조공정에서 활용하고 있는 Diaion HP-20 column chromatography방법으로는 EGCG와의 완전 분리가 어려워 최종제품에 혼입되게 됨으로서 결과적으로 최종제품의 순도를 떨어지게 하는 원인이 되었다. 또, 추출물을 Diaion HP-20 column chromatography방법으로 정제시 실험실 수준 (lab-scale) 혹은 시험생산 수준 (pilot-scale)에서와는 달리 EGCG와 함께 상당량의 caffeine이 함께 용출되었으며 따라서 제품 중에 혼입된 caffeine을 완제 제거하기 위하여 chromatography를 여러번 반복할 경우 작업시간 장기화 및 고비용 등의 문제가 발생하여 제조공정의 개선 및 수정이 불가피하게 되었다. 따라서 최종제품 GTE의 대량생산 system에서 발생한 최종제품 중 GCG 및 caffeine의 혼입으로 인한 제품순도 감소 문제를 원천적으로 해결하기 위하여 시도한 연구결과를 요약하여 보고하고자 한다.

2. 실험 방법

가. 시약 및 분석기기

HPLC는 Futecs HPLC system(NS-3000i integrated HPLC System, AT-4000 Column Oven, Korea) 및 kromasil 100-5-C18 (4.6 x 250 mm, 5 μ m) (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였다. HPLC 분석에 사용한 caffeine 및 (+)-catechin (C), (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epicatechin(EC), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-gallocatechin gallate(GCG), (-)-epicatechin gallate(EGC)는 Sigma-Aldrich (MI, USA)사에서 구입하였다. HPLC용 용매는 J.T Baker(water, MeOH) 및 Tedia(acetonitrile)제품을 사용하였다.

나. HPLC를 이용한 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’의 분석법

HPLC 분석 전 시료 액은 증류수로 희석 후 0.45 μ m syringe filter (0.45mm HV, Durapore[®])로 여과한 후 기기에 주입하였다. 이동상으로는 15 % acetonitrile in 0.1% acetic acid 용액을 1.0 ml/min의 유속으로 용출시켰다. 시료 주입량은 20 μ l로 하였으며, Oven(AT-4000 Column Oven, Futecs)의 온도는 35 $^{\circ}$ C로 유지하였다. 자외부흡광광도검출기(Model 500, Chrom Tech[®])를 사용하였으며 검출파장은 280 nm로 정하였다.^{1,16)}

다. 추출온도에 따른 EGCG의 GCG 전환율

시료 100 kg에 증류수 1,500 L를 가한 후 추출온도를 각각 35 $^{\circ}$ C, 45 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 80 $^{\circ}$ C에서 6 시간 추출하고 추출액 aliquot을 취하여 증류수로 희석한 후 0.45 μ m syringe filter(0.45mm HV, Durapore[®])로 여과한 후 HPLC 기기에 주입하였다. (Fig 2)

라. 강산성 양이온수지 (Trilite SCR-B)의 caffeine 흡착효과

시료 100 kg에 증류수 1,500 L를 가한 후 60 $^{\circ}$ C에서 6 시간 동안 추출하였다. 추출액 1.25 L, 1.50 L, 1.75 L을 따로따로 취하여 미리 H⁺ form으로 치환시켜둔 강산성 양이온수지 (Trilite SCR-B) column(4L, \varnothing 16 x 20 cm)에 각각 분당 20 ml씩 loading하였다. 용출액 aliquot를 취하여 증류수로 희석 후 0.45 μ m syringe filter(0.45mm HV, Durapore[®])로 여과한 후 HPLC 기기에 주입하여 caffeine의 존재유무를 확인하였다. (Fig 3)

또, 추출액 1.50 L 을 미리 H⁺ form으로 치환시켜둔 강산성 양이온수지 (Trilite SCR-B) column(4 L, \varnothing 16 x 20 cm)에 각각 분당 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml씩 loading하였다. 용출액을 증류수로 희석 후 0.45 μ m syringe

filter(0.45mm HV, Durapore[®])로 여과한 후 HPLC 분석을 통하여 caffeine의 존재유무를 확인하였다. (Fig 3). 또 추출액 1.50L을 미리 H⁺ form으로 치환시켜둔 강산성 양이온수지 (Trilite SCR-B) column(4 L, Ø16 x 20 cm)에 분당 20 ml의 유속으로 loading 하였다. 추출액의 loading이 종료된후 증류수로 Trilite SCR-B 수지를 세척하고 이 때 용출되는 용출액을 100 ml 씩 순차적으로 받은 후 각 용출액에 존재하는 EGCG 및 caffeine의 농도를 측정하였다. (Fig 4)

마. 기존공정에 따른 녹차 물추출물 및 EGCG 고함유 녹차추출물의 조제
실험에 사용한 건조녹차는 2016년, 전남 보성산을 구매하여 시료로 사용하였으며 표준시료는 (주)알앤오식품에 보관되어 있다. 개방형 추출 조에서 시료 100 g에 증류수 1.5 L를 가한 후 60 °C에서 6 시간씩 2회 반복추출하고 추출액은 여과지로 여과 후 여액 3L을 동량의 ethylacetate(EA)로 추출하고 EA층을 농축하였다. 농축된 EA층을 증류수 2 L에 현탁시킨 후 Diaion HP-20 column(100 ml, Ø4.0 x 15 cm)에 서서히 주입하여 흡착시켰다. 이후 Diaion HP-20 column을 4 L의 증류수로 수회 세척한 후 10% 주정, 20% 주정, 30 % 주정용액을 각각 500 mL 씩 단계적으로 용출시켰으며 이 중 20 % 주정 용출분을 취하여 주정이 제거될 때까지 농축하고 농축액은 같은 방법으로 Diaion HP-20 column chromatography를 한 번 더 반복하고 잔류 주정이 제거될 때까지 농축하여 생성되는 흰색 분말을 여과하였다. 여과된 분말은 물에 녹인 후 재결정을 반복하여 최종적으로 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’ (GTE) 1.2 g을 얻었다.¹⁵⁾

바. 개선된 공정에 따른 녹차 물추출물 및 EGCG고함유녹차추출물의 조제
개방형 추출조에서 시료 100 kg에 증류수 1,500 L를 가한 후 45 °C에서 6 시간씩 2회 반복추출하고 추출액은 여과 후 여액을 미리 H⁺ form으로 치환시켜 둔 Trilite SCR-B column (4 L, Ø16 x 20 cm)에 분당 40 ml로 loading 하였다. 이후 column을 증류수 10 L로 세척하였으며 용출액과 세척액을 합하여 즉시 Diaion HP-20 column (Ø4.0 x 15 cm)에 서서히 주입하여 흡착시켰다. 이후 Diaion HP-20 column을 증류수로 수회 세척한 후 10 % 주정, 20 % 주정, 30 % 주정용액을 각각 400L 씩 단계적으로 용출시켰으며 이 중 20 % 주정 용출분을 취하여 주정이 제거될 때까지 농축하고 이때 생성되는 흰색 분말을 여과하였다. 여과된 분말은 물에 녹인 후 재결정을 반복하여 최종적으로 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’ (GTE) 5.2 Kg을 얻었다. (Fig. 5)

3. 결과 및 고찰

신규 건강기능식품 소재 ‘EGCG고함유 녹차추출물(GTE)’의 제조공정 표준화 및 대량생산을 위한 최적의 제조 조건을 도출하고자 추출조건 및 제조공법을 재검토하였다. 이를 위하여 우선 추출용매, 추출시간, 온도, 압력 등의 공정변수에 따른 최종제품의 수율을 지표로 하여 추출조건을 재설정하고자 시도하였다. 일반적으로 대량 추출을 목적으로 하는 500 L - 2 kL 규격의 대형 추출조는 추출효율을 높이기 위하여 적절하게 압력을 조절할 수 있도록 밀폐형 탱크형태로 제작되어 있으며 시중에서 가장 널리 사용되고 있다. 그러나 최소량 (10배)의 물을 추출용매로 사용하여 건조 녹차를 대형농축기 내에서 추출할 경우 EGCG를 포함한 차카테킨 성분 이외에 다수의 부산물이 생성되는 결과가 발생되어 GTE의 양산을 위하여서는 밀폐형 탱크 추출조를 사용하는 추출방법은 부적합하다는 결론에 도달하였다. 추출과정 중 얻어진 부산물들을 분리하여 HPLC 분석 및 NMR, MS 등 분광학적 자료들을 토대로 동정한 결과 이들 부산물들은 각각 EGCG, EGC, ECG 성분의 3-epimer인 gallocatechin gallate(GCG), gallocatechin(GC) 및 catechin gallate(CG) 등으로 확인되었으며 시료량의 10 배에 해당하는 물을 사용하여 80 °C에서 6 시간 동안 추출한 추출물의 경우 EGCG와 gallocatechin gallate(GCG)의 비율이 3 : 1 정도로 나타났다. 이와 같은 결과는 Ikeda²⁾ 등의 연구결과와 잘 일치되고 있으며 EGCG이 GCG로 전환되는 epimerization 현상은 고열 및 고압에 노출되는 시간에 비례하여 가속화됨을 알 수 있었다. 또, 추출과정 중에 생성된 GCG는 기존의 제조공법에서 활용한 Diaion HP-20 column chromatography방법 뿐만 아니라 타 chromatography 방법으로도 EGCG와의 완전분리가 어려워 최종제품 중에 혼입되게 됨으로서 결과적으로 최종제품의 순도를 떨어뜨리게 된다. 따라서 이와 같이 추출과정 중에 일어나는 유효성분 EGCG의 epimerization 현상이 최소화 될 수 있는 추출온도를 설정하고자 추출온도에 따라 EGCG가 GCG로 전환되는 비율을 검토하여 보았다. 그 결과 Fig 2와 같이 추출온도를 각각 35 °C, 45 °C, 50 °C, 80 °C에서 6 시간 추출하여 얻은 추출물의 HPLC 분석결과를 살펴보면 추출온도가 45 °C 이하에서는 EGCG의 일부가 GCG로 전환되는 현상이 관찰되지 않았으나 추출온도가 50 °C 이상에서는 GCG가 생성되기 시작하였으며 추출온도를 80 °C로 한 경우에는 EGCG의 15 - 20 %가 GCG로 전환됨을 관찰할 수 있었다 (Fig 2). 따라서 GTE의 양산을 위하여서는 비록 추출효율이 떨어질 수는 있지만 추출압력이 발생할 수 있는 밀폐형 추출조의 사용을 피하고 추출온도도 50 °C 이하에서 진행하여야 GCG 등 불필요한 부산물의 생성을 원천적으로 배제할 수 있으리라 사료된다. 다음으로 Diaion HP-20 column chromatography방법으로 추출물을 정제시

실험실 수준 (lab-scale) 혹은 시험생산 수준 (pilot-scale)에서와는 달리 대량 생산 system에서는 EGCG와 함께 상당량의 caffeine이 함께 용출되며 혼입된 caffeine을 완제 제거하기 위하여 chromatography를 여러번 반복할 경우 발생하는 작업시간 장기화 및 고비용 등의 문제점을 해결하고자 추출물을 Diaion HP-20 column chromatography으로 정제하기 이전에 추출물에 함유된 caffeine을 미리 모두 제거하는 방법을 모색하였으며 그 일환으로 이온교환수지 사용법을 검토하였다. 이를 위하여 식품 제조공정에서 사용 가능한 여러가지 이온교환수지를 사용하여 추출물에 함유된 caffeine에 대한 흡착능을 테스트하여 본 결과 강산성 양이온 교환수지를 제외한 기타 수지 (약산성 양이온 교환수지, 강염기성 음이온 교환수지 등)들은 흡착능이 미미하여 제조공정에 적용할 수가 없었다. 따라서 EGCG 정제과정 이전에 녹차 추출물에 함유된 caffeine을 미리 제거하는 방안으로 추출물을 식품 제조공정에서 널리 사용되고 있는 강산성 양이온수지 Trilite SCR-B column을 통과시켜 caffeine을 수지에 모두 흡착시킨 후 Trilite SCR-B 수지를 통과한 용출액 (eluate)을 기존의 제조공정에 따라 정제하는 방식으로 ‘EGCG고함유 녹차추출물(GTE)’ 를 제조하였다. 이를 위하여 사용한 강산성 양이온수지 Trilite SCR-B에 caffeine 성분이 흡착되는 능력 및 교환용량(capacity)을 검토하였다. 그 결과 Trilite SCR-B (4 L, $\varnothing 16 \times 20$ cm)는 최소한 녹차추출물 1.5 L (건조중량 약 550 g)에 존재하는 caffeine을 모두 효과적으로 흡착시킬 수 있다고 판단되며 결론적으로 녹차추출물에 대한 Trilite SCR-B 수지의 교환용량(capacity)은 350g/L 이상이라고 판단할 수 있었다. (Fig 3) 또, 녹차추출물을 Trilite SCR-B column을 통과시켜 caffeine을 흡착시킬 시 추출물의 loading 속도에 따라 caffeine이 수지에 어느 정도 흡착될 수 있는지를 알아보기 위하여 loading 속도를 분당 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml씩 조절하여 본 결과 loading 속도가 50 ml를 초과한 경우에는 상당량의 caffeine이 수지에 흡착되지 못하고 용출되었다. (Fig 3) 또, 녹차추출물을 Trilite SCR-B column을 통과시켜 caffeine을 완전히 흡착시킨 Trilite SCR-B 수지를 세척시 세척액은 어느 정도의 양이 필요한지를 알아보려고 증류수로 Trilite SCR-B 수지를 세척하고 이 때 용출되는 세척액을 순차적으로 100 ml 씩 받은 후 각 세척액에 존재하는 EGCG 및 caffeine의 농도를 측정하였다. (Fig 4) 그 결과 Fig 4와 같이 세척액 중의 EGCG 농도는 처음 500 ml 세척액 이후부터는 급격히 감소하여 1,000 ml 세척액 이후에는 거의 검출이 되지 못하였다. 반면 caffeine은 모든 세척액에서 검출이 되지 않아 녹차추출물에 존재하는 caffeine은 모두 Trilite SCR-B 수지에 성공적으로 흡착이 됨을 알 수 있었다. 또 녹차추출물에 존재하는 caffeine을 제외한 기타 성분들은 Trilite SCR-B 수지 용량 대비 2.5 배 정도에 해당하는 양의 증류수로 수지를 세척하면 모두 용출됨을 확인할 수 있었다. (Fig 4) .Trilite SCR-B 수지

를 통과한 용출액을 Diaion HP-20 column chromatography 방법으로 정제하는 제조공정은 기존의 제조공정과 같이 용출용매 중 주정의 함량을 높여주는 gradient 방식으로 진행하였으며 Trilite SCR-B 수지 처리를 통하여 caffeine 성분이 모두 제거된 관계로 단 일회의 chromatography 공정으로 ‘EGCG고함유 녹차추출물(GTE)’ 를 효과적으로 제조할 수 있었다.(Fig 5) 아울러 기존의 제조공정에서는 Diaion HP-20 column chromatography 과정이 보다 원활하게 진행될 수 있도록 편의상 녹차 추출물을 ethylacetate(EA)로 추출한 후 EA로 이행된 분획만을 취하여 chromatography를 실시하여 최종제품을 생산하여 왔으나 개선된 제조공정에서는 녹차 추출물을 ethylacetate(EA)로 추출하는 공정을 생략하고 녹차 추출물을 Trilite SCR-B 수지 처리 후 얻어진 용출액을 그대로 Diaion HP-20 column에 흡착시킨 후 chromatography를 실시하므로써 제조공정이 기존의 제조공정에 비하여 훨씬 단순화되었으며 부가적으로 녹차열수추출물을 ethylacetate(EA)로 재추출하는 공정도 생략할 수 있었다.

4. 결론

물과 주정(spirit, ethanol)만을 사용한 간편 chromatography 방법에 따라 녹차 열수추출물로부터 EGCG (epigallocatechin gallate)만 98% 이상 함유된 ‘EGCG 고함유 녹차추출물’ (GTE : epigallocatechin gallate-rich green tea extract)을 고수율로 확보할 수 있는 제조공법을 대량생산 공정에 적합하게 개선하였다. 기존의 제조공법은 시험생산 수준(pilot-scale)에 적합하도록 최적화된 방법으로서 본 제조공법을 그대로 대량생산 공정에 적용시 최종제품 중에 상당량의 GCG 및 caffeine이 혼입되어 제품순도가 감소되는 현상이 야기되었다. 추출기를 개방형으로 바꾸고 추출온도를 45 °C 이하로 조절한 결과 추출효능은 감소되었으나 EGCG의 epimerization 현상으로 생성된 GCG는 더 이상 생성되지 않았으며 최종제품 중에 GCG는 더 이상 발견되지 아니하였다. 또, 최종제품에 caffeine이 혼입되는 현상은 원천적으로 차단하고자 추출물을 Diaion HP-20 column chromatography으로 정제하기 이전에 미리 강산성 양이온수지 Trilite SCR-B 수지를 통과시켜 추출물에 존재하는 caffeine을 모두 수지에 흡착시키는 방법을 채택하였다. 수지에 흡착되지 않고 용출된 용출액 (eluate)을 기존의 제조공정에 따라 Diaion HP-20 column chromatography 방법에 따라 정제한 결과 단시간 내에 고수율의 ‘EGCG고함유 녹차추출물(GTE)’ 를 간편하게 제조할 수 있었다.

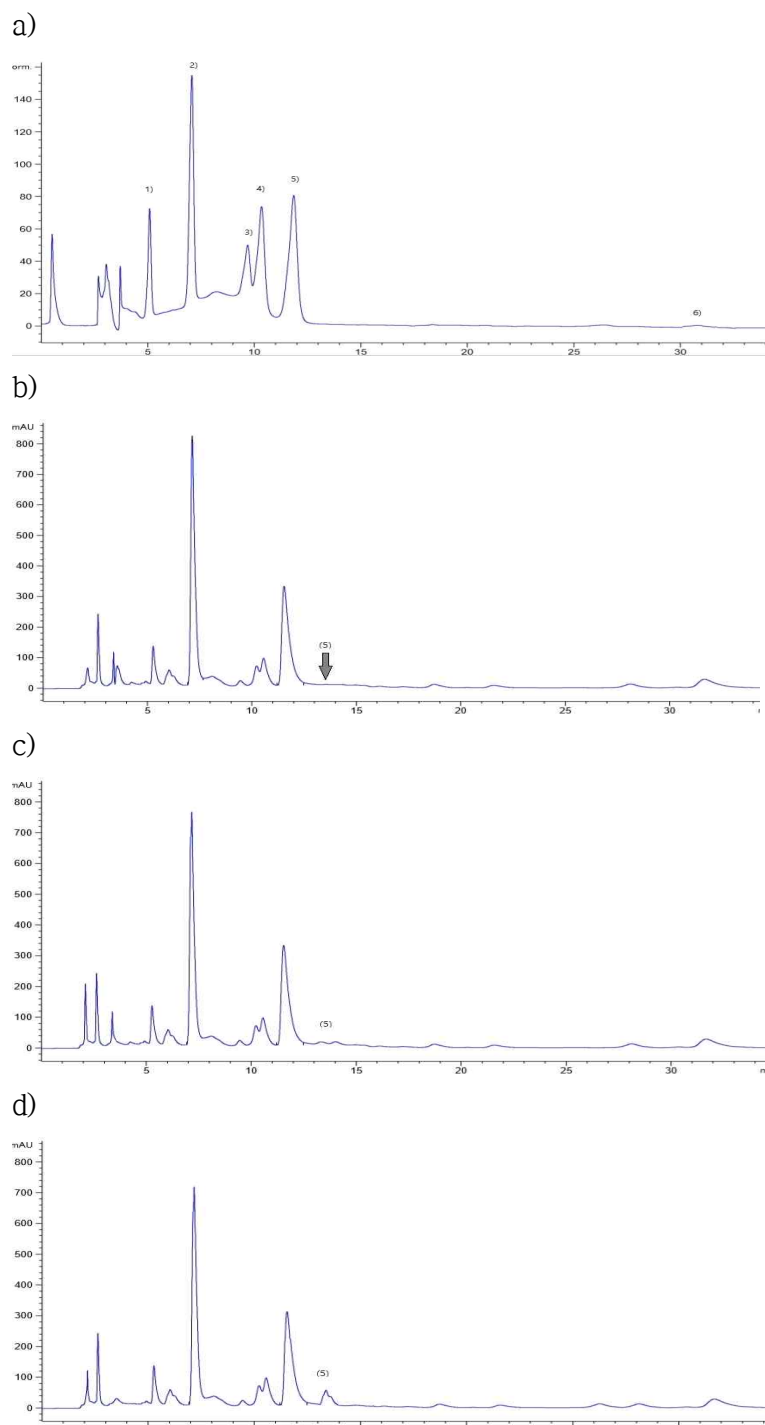


Fig. 2. HPLC chromatogram of a) standard 5 catechins, GCG and caffeine b) whole extract of green tea extracted at 45 °C, c) whole extract of green tea extracted at 50 °C d) whole extract of green tea extracted at 45 °C
 HPLC: column; kromasil 100-5-C18 (4.6 X 250) mobile phase; 15 % acetonitrile in 0.1% acetic acid, detection; UV 280nm. Peaks: 1. EGC, 2. caffeine, 3. EC, 4. EGCG and 5. GCG 6. ECG.

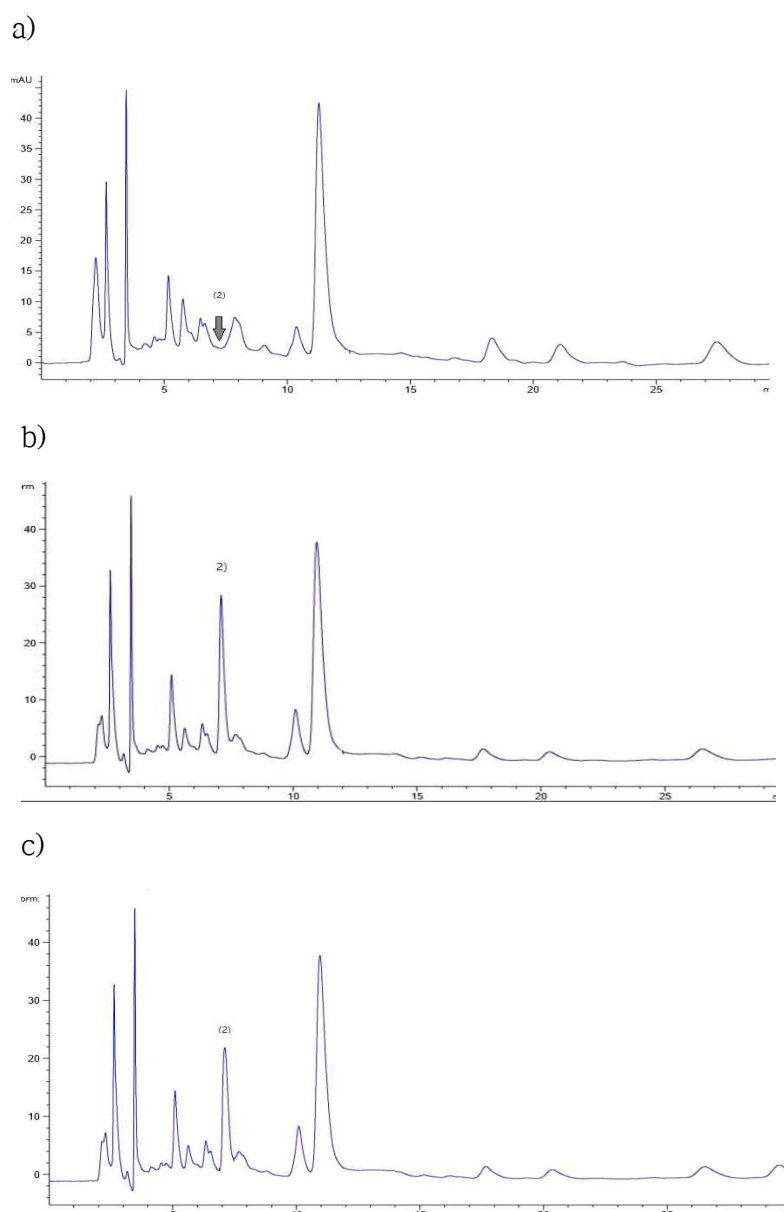


Fig. 3. HPLC chromatogram of a) eluate passed through cation exchange resin loaded with 1.5 L of green tea extract with a flow rate of 30 ml/min b) eluate passed through cation exchange resin loaded with below 1.75 L of green tea extract with a flow rate of 30 ml/min a) eluate passed through cation exchange resin loaded with below 1.5 L of green tea extract with a flow rate of 50 ml/min.

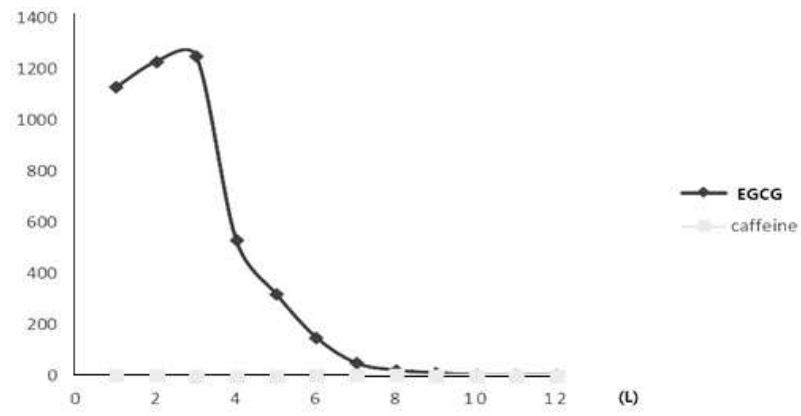
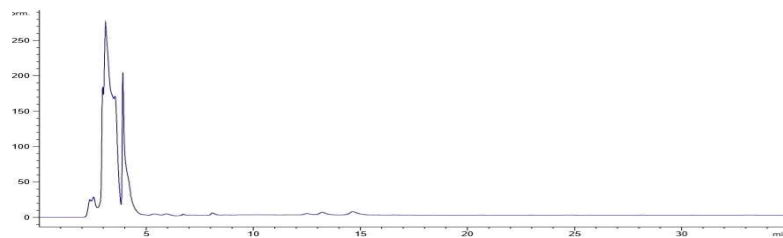
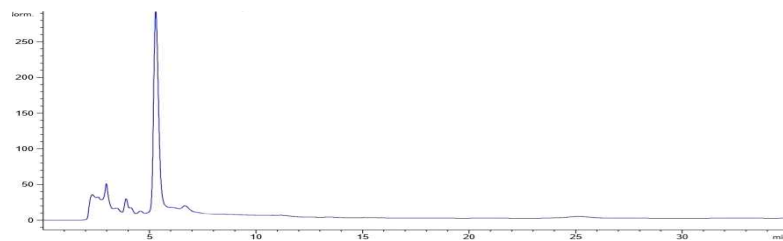


Fig. 4. EGCG and caffeine content in each 100 ml eluate passed through cation exchange resin

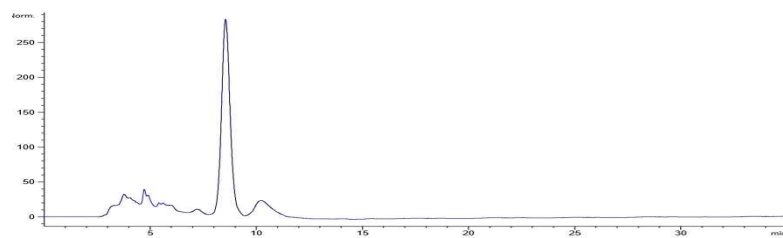
a)



b)



c)



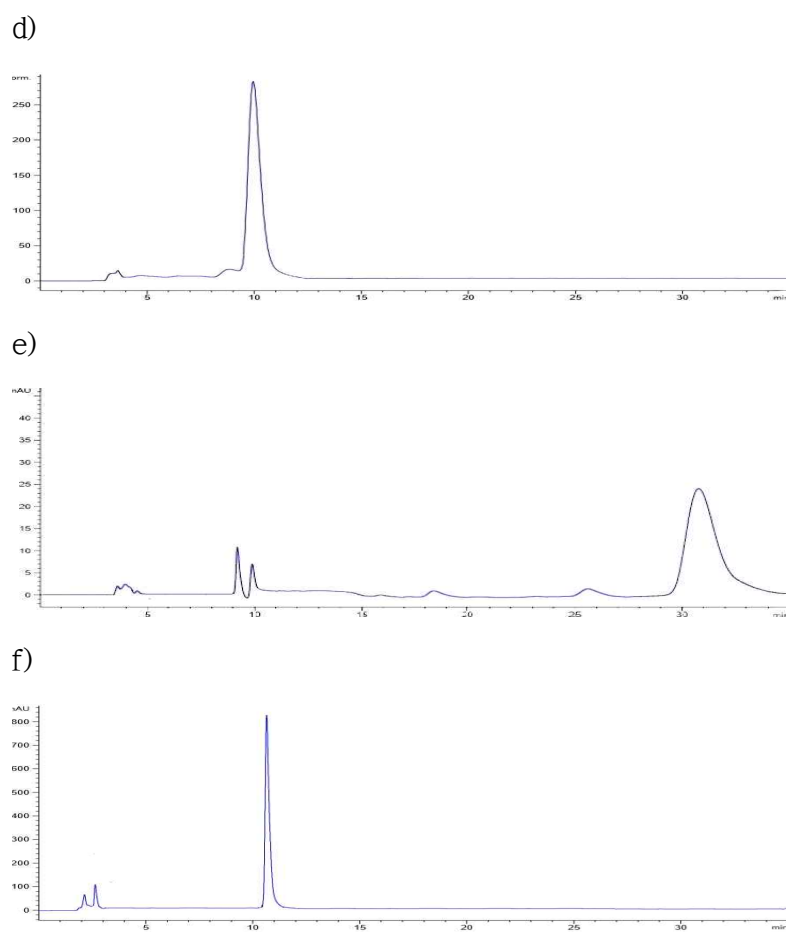


Fig. 5. HPLC chromatogram of a) eluate eluted with H₂O, b) eluate eluted with 10 % EtOH, c) eluate eluted with 15 % EtOH, d) eluate eluted with 20 % EtOH, e) eluate eluted with 25 % EtOH, f) GTE obtained from eluate eluted with 20 % EtOH.

제5절 녹차소재의 점진적 양산화 및 시생산(Pilot)

1. 개요

실험실 수준의 제조 기준이 그대로 대량생산에 적용되기는 쉽지 않기 때문에 불량률을 최소화하기 위해서 점차적으로 생산량을 늘려가며 표준공정 기준을 새롭게 설정하고자 한다. 한 예로, 소규모 단위의 분리정제 시 Diaion HP-20 크로마토그래피에서 물-주정계로 카테킨이 잘 분획되던 것이 Pilot 수준에서는 카테킨 분획물에 카페인이 혼입되는 현상이 나타나서 탈카페인 (decaffeinated)하기 위하여 양이온수지를 거치는 새로운 과정을 추가로 도입하게 되었다. 이와 같이 양산화 과정에서 어떤 새로운 변수가 나타날지 알 수 없으니 점차적으로 생산량을 늘려가며 양산화 과정을 습득할 필요가 있다.

2. 재료 및 방법

Lab-scale생산과 대량 생산에서의 수율 차를 극복하기 위하여 점진적으로 양을 늘려가며 1차: 녹차건엽 100kg, 2차:녹차건엽 500kg, 3차:녹차건엽 2톤, 4차:녹차건엽 5톤으로부터 고순도 EGCG 소재를 반복, 생산하였다.

가. 추출공정(추출기, 농축기)



나. 용매분배공정(용매분배기, 농축기)



다. 분획공정(크로마토그래피, SUS컬럼, 농축기)



라. 재결정화공정(재결정기)



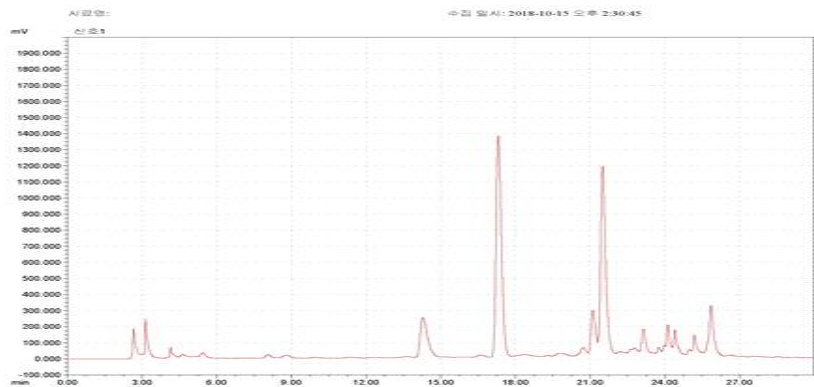
3. 결과

가. 점진적 양산화 과정에서의 단계별 소요시간, 수율

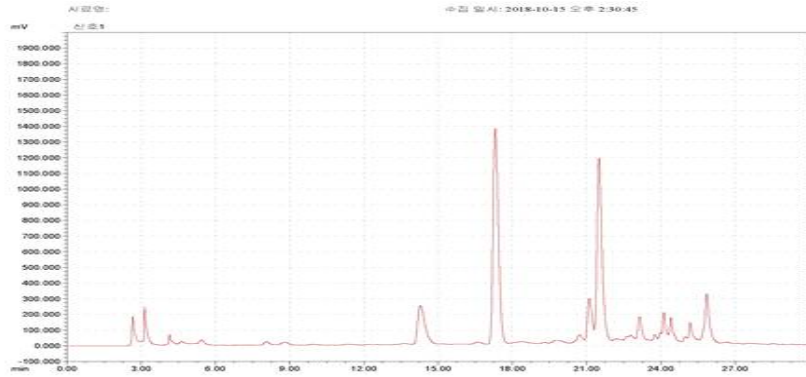
원료량 (녹차건엽)	공정별	소요 시간	생산비용 (재료비,천원)	최종 products 무게	수율
100kg (보성산, 건조엽)	추출및농축 분배및농축 분획및농축 재결정및동결건조	4 day 3 day 9 day 12 day	12,200	5.6kg	5.60%
500kg (보성산, 건조엽)	추출및농축 분배및농축 분획및농축 재결정및동결건조	4 day 3 day 9 day 12 day	18,420	26.5kg	5.31%
2톤 (보성산, 건조엽)	추출및농축 분배및농축 분획및농축 재결정및동결건조	5 day 5 day 10 day 14 day	26,440	104kg	5.02%
5톤 (보성산, 건조엽)	추출및농축 분배및농축 분획및농축 재결정및동결건조	7 day 8 day 12 day 14 day	44,310	247kg	4.94%

나. 3차 반복(2톤) 시 공정단계별 분석결과

(1) 열수 추출액 분석자료(1단계 공정)



(2) 용매분배 상층액(EA) 분석자료(2단계 공정)



(3) Diaion HP-20 분획별 분석자료(3단계 공정)

(가) H₂O층 500ml 1/20희석



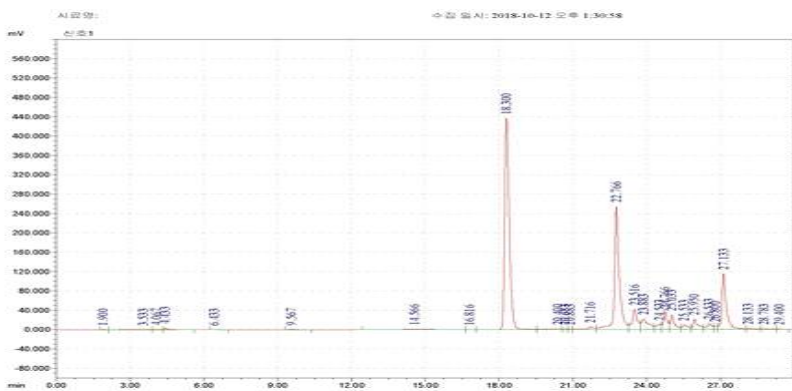
(나) 10% EtOH층 500ml 1/20희석



(다) 20% EtOH층 500ml 1/20희석



(라) 30% EtOH층 500ml 1/20희석



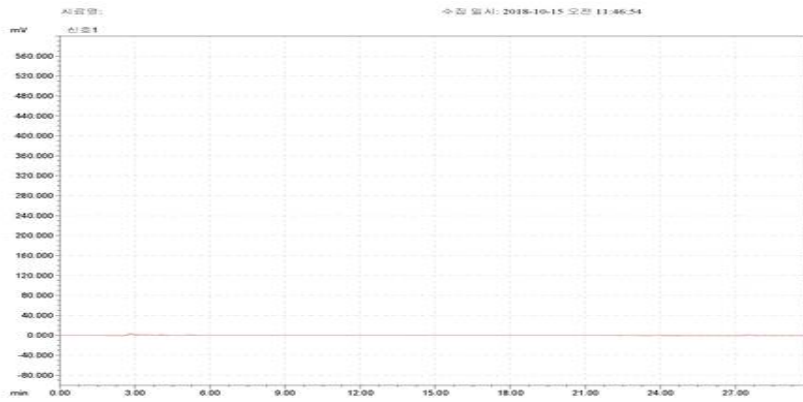
(마) 100% EtOH층 500ml 1/20희석



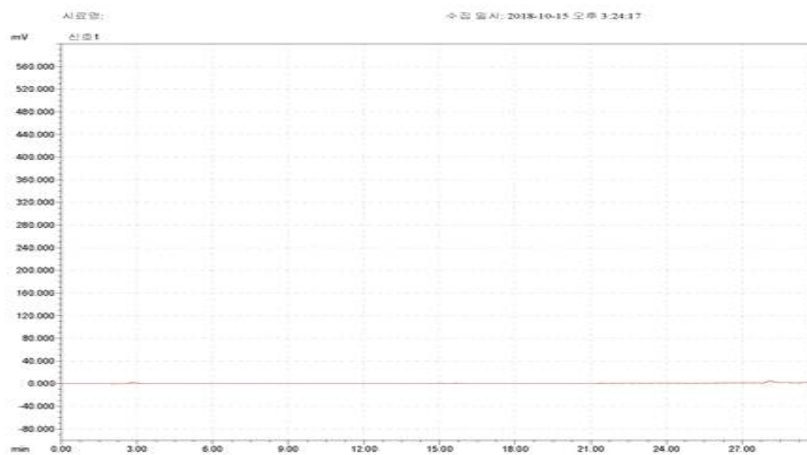
(바) 100% MeOH층 500ml 1/20희석



(사) 2N NaOH층 500ml 1/20희석



(아) 100% MeOH층 500ml 1/20희석



이상에서와 같이 Diaion HP-20 크로마토그래피 과정에서 카테킨을 분획하고 이를 다시 양이온에 통과하여 탈카페인한 후 최종적으로 재결정화하여 탈카페인, EGCG 고함유 녹차소재의 대량생산이 가능해졌다.

제6절 시제품 개발을 위한 배합실험 및 제형제제화

1. 개요

약물을 투여하기에 적합한 형체와 성상으로 조제하는 것을 말하는데 보통 원료가 되는 약물 투여를 용이하게 하기 위하여 부형제를 첨가하여 캡슐, 정제, 분말, 액상(드링크제) 등으로 사용하게 된다. 여기서 성상(description)은 시료의 성질과 상태를 아울러 이르는 말로서 부형제는 첨가제의 일종으로 정제의 적절한 크기와 경도 등을 부여하기 위하여 사용되는 물질이다.

2. 실험방법

가. pre-formulation의 필요성

- (1) 안정성 있는 유효한 제제 설계를 위해 원료물질의 물리화학적 성상 및 특이성 파악이 필수적이다.
- (2) Pre-formulation에서 고려해야 할 물리화학적 성상: 용해도, 분배계수, 용출속도, 물리적 형태 및 안정성.

나. 생물약제학적 분류체계(BCS: Biopharmaceutic Classification System)

- (1) 약물흡수 속도와 정도를 결정짓는 주요인자로서 약물용출과 장관투과성이 있는데
 - (가) In vitro상의 약물 용출
 - (나) in vivo상에서의 생체이용률
 - *생체이용률(bioavailability): 같은 약물이라도 결정형, 순도, 제제형태, 부형약제의 종류에 따라 생리학적 효과(흡수성, 삼투성 등)가 다르다.
- (2) 약물용해도(solubility)
 - (가) 약물 발현을 위한 약물의 적정한 물에 대한 용해도가 유지되어야 함
 - (나) 약물성분의 친수성, 지질 친화도가 적절히 요구됨
 - (다) 용해도 증가시키는 방법으로 염 혹은 에스터(ester) 유도체로 합성하거나 약물입자 크기를 줄이는 방법
- (3). 분배계수(partition coefficient)
 - (가) 약물의 친수성과 소수성 상에 분배되는 정도를 나타내는 지표로서 옥탄올-물 분배계수 생체막이 갖는 지질친화성과 가장 유사해서 처방화 개발 단계에서 널리 사용함
 - p =옥탄올중 약물 농도/수상중 약물농도
 - 분배계수 p 가 클수록 막투과성 증가

(나) 약리적 효능 발현 요건으로서 투여된 약물의 단백질과 지질로 구성된 세포막을 어떻게 통과하느냐에 달려 있는데

-세포막 투과능력 차이: 지질친화력(lipophilic) 또는 물친화적(hydrophilic) 정도

(4) 용출속도(dissolution rate)

약물이 용매에 녹는 속도를 말하는 것이며 약물의 흡수능력을 예측할 수 있는데 용출속도에 미치는 영향으로는

-화학적 특성: 약물의 산-염기 상태, 염(salt)의 형태

-물리적 특성: 약물입자 크기, 결정성, 비결정성(무정형)

(5) 물리적 형태

약물의 결정성, 무정형, 입자 크기가 용출속도를 좌우함

(6) 안정성

환경적 용인이 약물의 안정성이 미치는 영향

-약물 안정성 시험요소: 온도, 습도, 시험기간, 빛과 공기에 노출 여부

-안정성 정보: 유효기간 포장, 보관, 배송조건 등 설정 요소

3. EGCG소재에 대한 포물레이션 측면에서의 적용(결과)

EGCG소재를 투여하기 적합한 형태와 형상으로 조제하기 위하여 1)어떤 부형제를 사용하여 조성비율을 결정할 것인지, 2) 어떤 형태, 즉 정제, 캡슐, 분말, 액상 등 어느 것이 세포막 침투에 가장 효율적인지를 결정하고자 한다.

의약품과 달리 건기식은 약물 용해도나 분배계수, 용출속도 등을 높이기 위해 화학적 성분 자체를 변형하는 것은 어렵기 때문에 물리적 형태를 어떻게 조절하느냐가 우선의 관건이다. 약물의 결정성, 무정형, 입자크기를 조절하는 것 외에는 특별한 방법이 없어 보인다.

가. 약물 용해도 측면 고찰

(특별한 고려 대상이 아님)

나. 분배계수 측면 고찰

(특별한 고려 대상이 아님)

다. 용출속도 측면 고찰

(1) 기준용출시험

식품공전 일반시험법 중 용출시험법 제2법에 준하였다.

-용출액: 0.01 mol/L HCl

- 온도: 37°C +/- 0.5 °C
- 용출액량: 500ml
- 회전속도: 100rpm
- 용출시간: 20hr

(2) 시험조건

- 검액: 용출 시작후 각 측정시간마다 용액을 채취하여 10um필터로 여과 후 이 용액을 검액으로 사용하였다.
- 측정시간에 따른 방출 조건



- 1 hr: 10~20%
- 6 Hr: 40-55%
- 12 hr: 65~85%
- 20 hr: 85% 이상

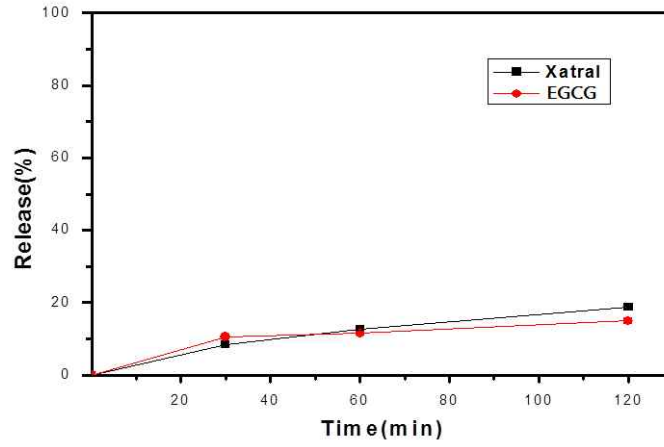
- HPLC를 이용하여 용출된 약물의 농도를 계산한다.

(3) 비교용출시험

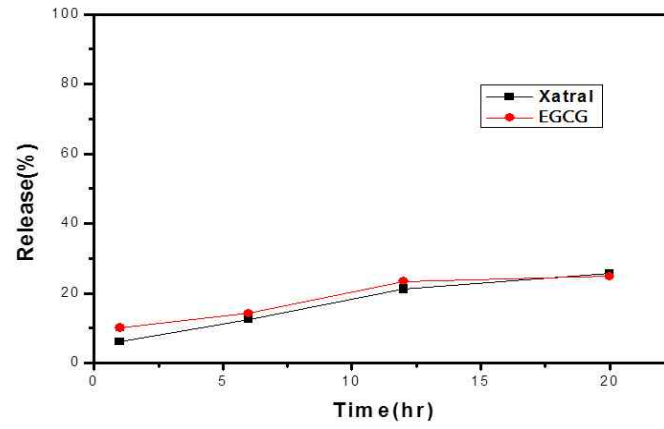
- 식품공전의 일반시험법중 영출시험법 제2법에 의거한다.
- 용출액: pH 1.2: 붕해시험법 제1액(인공위액)
pH 4.0: 초산염완추액
pH 6.8: 붕해시험법 제2액(인공장액)
Water : 3차증류수

- 온도: 37°C +/- 0.5°C
- 용출액량: 900mL
- 회전속도: 50 rpm
- 용출시간: pH 1.2: 2 hr
pH 4.0, 6.8, water: 20 hr

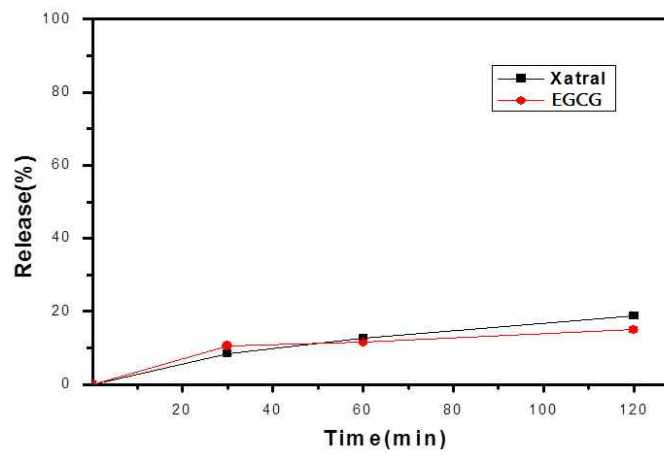
(가) pH 1.2, 50 rpm 용출시험결과



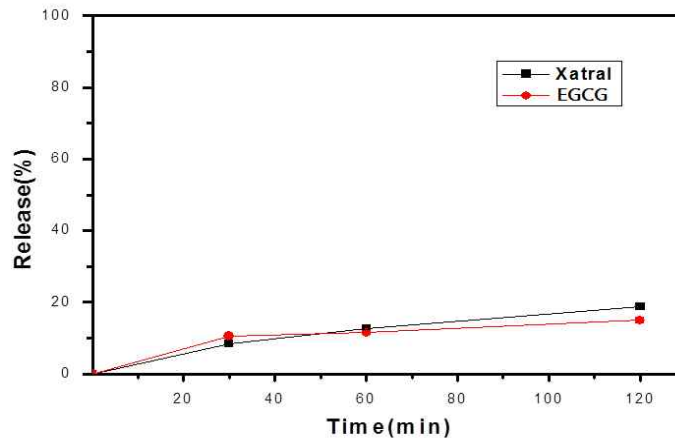
(나) pH 4.0, 50 rpm 용출시험결과



(다) pH 6.8, 50 rpm 용출시험결과



(라) Water, 50 rpm 용출시험결과



용출시험결과, 기준 용출액과 비교용출을 시험하였으며 모든 용출액에서 대조약과 유사한 약물 방출 결과를 유도할 수 있었음. In vitro상에서의 용출결과로 볼 때, In vivo 상에서도 대조약과 같은 생물학적 동등성을 입증할 것으로 판단된다.

라. 물리적 형태

EGCG소재는 제조, 건조 시 가열할 경우 갈변현상이 뚜렷하기 때문에 동결건조를 원칙으로 함. 그러다보니 건조된 케익을 분쇄하면 분말이 가벼워 날릴 정도여서 캡슐화가 결코 쉽지 않음. 따라서 용출속도에 영향을 주는 EGCG 자체 약물의 결정성, 무정형, 입자 크기는 별다른 의미가 없다. 그렇기 때문에 먼저 해결해야 할 점은 동결건조 후 가벼워진 무정형 분말을 어떻게 처리해서 캡슐화 과정을 용이하게 할 것인가를 우선 고려해야 함. 따라서 다양한 부형제를 일정 비율로 혼합한 후 동결건조를 하는 방법을 택하였음. 검토한 부형제로는 유당, 비타민 C, 셀룰로오스, 밀크씨슬(실리마린), 가르시아캄보지아추출물(HCA), 공액리놀렌산(CLA) 등이 있으며 이중 유당(lactose)과 비타민(vitamin) 씨(C) 위주로 실험하였다.

(1) EGCG/Lactose (1:1)



(2) EGCG/Lactose (70:30)



(3) EGCG/Lactose (80:20)



(4) EGCG/Lactose (90:10)



(5) EGCG/Lactose (95:5)



(6) EGCG/Vitamin C (80:20)



(7) EGCG/Vitamin C (90:10)



(8) EGCG/Vitamin C (95:5)



4. 결론

상기 실험에서 대체로 5~10%의 부형제(유당 혹은 비타민 씨)를 EGCG 소재와 혼합하여 동결건조한 시료는 유동성(흐름)이 좋은 편이어서 자동 캡슐화가 가능해 짐. 그러나 비타민 C는 공기 중 산화되어 갈변현상을 나타내기 때문에 EGCG소재와 혼합하면 색상을 분홍색으로 변색시키므로 가능하면 부형제는 유당을 사용하도록 권장한다.

제7절 제품디자인 개발

1. 네이밍개발

브랜드명: 알오고 CGTE (원료제품)

알오고 [스틱형 제품(80mg/stick), 커피첨가물]

알오고 골드 [캡슐형 제품(260mg/caps), 건기식]

2. 브랜드이미지 및 패키지



- 제품명: 알오고 프리미엄
- 내용량: 135 mg, 120캡슐(16.2 g)
- 식품의약품안전처(식품안전처) 제정원료의약품의 도음을 줄 수 있는 카페인 무 함유 건강기능식품
- 원재료명 및 함량: 녹차 유래 천연성분 EGCG (98%) 및 ECG(2%) • 제제번호: AQ-00334
- 함유기재: 폴리비닐피롤리돈, 정제수, 분말산, 지방산염(스테arate)
- 제조사: (주)진원(서울특별시 강남구 삼성동 삼성로 224)
- 판매처: (주)진원(서울특별시 강남구 테헤란로 11-1)
- 고령화성분: 1522-2983 • 변질 및 고형 구입처 및 판매처
- 본 제품은 공정거래위원회 고시 소비자분쟁해결 규정에 의거 교환 또는 보상을 받을 수 있습니다.
- 유효기간: 제조일로부터 6개월
- 무장 • 불방출성 신기술 관련번호: 1369
- 원산지: 한국 / Made in Korea
- 용기재질: 용기(PCPE)/뚜껑(PF)

다이어트·피부건강 개선

알오고 프리미엄

Caffeine-free

체지방 감소
보습/가습

135 mg (120캡슐)

다이어트·피부건강 개선

Alologo premium

알오고(Alologo) 제품 특징

1. 체지방 감소 / 보습 가능
2. 카페인 함량의 고순도 EGCG(98%) 천연소재
3. 지방 흡수 억제작용에 의한 배변 억제, 체내 에너지 소모량 증가, 복용 후 운동시 체중 감량 속도 증가 효과
4. 카페인 불 함유 (caffeine-free)
5. 친환경적 제형성 공법에 의해 제조

보관방법
직접 햇빛에 보관하고 공기보관 시 병뚜껑에 저장하십시오. 파손을 방지 위하여 이면에 실은 지침을 꼭 지켜주세요.

섭취량 및 섭취 시 주의사항
1일 1~2회, 1회 1캡슐 (캡슐 속 내용물 채로 드시면 편합니다)

- 제품명: 알오고 프리미엄
- 내용량: 135 mg, 60캡슐(9.7 g)
- 식품의약품안전처(식품안전처) 제정원료의약품의 도음을 줄 수 있는 카페인 무 함유 건강기능식품
- 원재료명 및 함량: 녹차 유래 천연성분 EGCG(98%) 및 ECG(2%)
- 함유기재: 폴리비닐피롤리돈, 정제수, 분말산, 지방산염(스테arate)
- 제조사: (주)진원(서울특별시 강남구 삼성동 삼성로 224)
- 판매처: (주)진원(서울특별시 강남구 테헤란로 11-1)
- 고령화성분: 1522-2983 • 변질 및 고형 구입처 및 판매처
- 본 제품은 공정거래위원회 고시 소비자분쟁해결 규정에 의거 교환 또는 보상을 받을 수 있습니다.
- 유효기간: 제조일로부터 6개월
- 무장 • 불방출성 신기술 관련번호: 1369
- 원산지: 한국 / Made in Korea
- 용기재질: 용기(PCPE)/뚜껑(PF)

다이어트·피부건강 개선

알오고 프리미엄

Caffeine-free

체지방 감소
보습 가능

135 mg (60캡슐)

다이어트·피부건강 개선

Alologo premium

알오고(Alologo) 제품 특징

1. 체지방 감소 / 보습 가능
2. 카페인 함량의 고순도 EGCG(98%) 천연소재
3. 지방 흡수 억제작용에 의한 배변 억제, 체내 에너지 소모량 증가, 복용 후 운동시 체중 감량 속도 증가 효과
4. 카페인 불 함유 (caffeine-free)
5. 친환경적 제형성 공법에 의해 제조

Store sealed in a cool dry area

Commitment to quality Program
Sourced and manufactured to avoid:
- Artificial Additives, - Allergens
- GMOs, - Environmental Contaminants
- Added Excipients
* See Ingredients Panel for more information

Recommendations: As a dietary supplement, take 1-2 capsules daily, in divided doses, with meals.
Tamper Resistant: Use only if safety seal is intact.
Warning: If pregnant, consult your physician before taking this or any other products.
Keep out of the reach of children

green tea extract containing 98% EGCG

Alologo premium

Caffeine-free

Body fat diets
Moisturizing

135 mg (60 capsules)

green tea extract containing 98% EGCG

Alologo premium

Supplement Facts
Serving Size: 1 Capsule
Amount per container (60)

	Amount per serving	% Daily Value
Green Tea Extract (standardized to contain 98% EGCG)	135 mg	100%

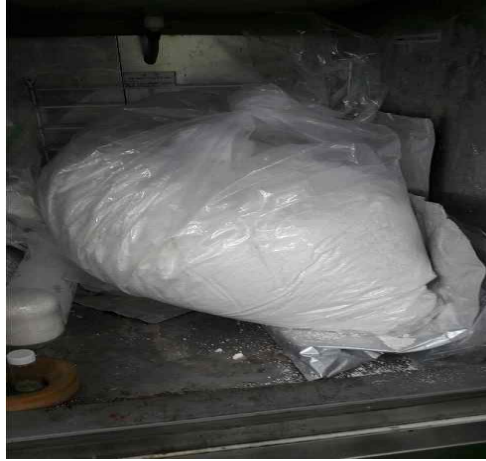
Other ingredients: vegetable capsules, cellulose, silica, water.
Alologo is a registered trademark of ABO Food Inc.

3. 단상자 설계및제작





[제품1] 원료제품



[제품2] 커피맛츄형 기능성첨가제(스틱)



[제품3] 건강기능식품(캡슐)



제8절 임상시험 위한 시험약(제품) 설계 및 제작

1. 배합비 설계

가. 진약(380mg/1cap)

녹차추출물 -----	50.0%(190mg)
결정셀룰로오스-----	49.8%(189.24mg)
카르복시메칠셀룰로오스칼슘-----	0.1% (0.38mg)
이산화규소 -----	0.1% (0.38mg)

나. 위약(380mg/1cap) 배합비 설계

결정셀룰로오스 -----	99.89%(379.5mg)
이산화규소 -----	0.1% (0.38mg)
적색40호(색소) -----	0.003%(0.01mg)

다. 공통 시험 규격

성상 : 상하부 암녹색의 경질캡셀로 내용물은 연갈색의 고운 분말

붕해 : 20분 이내(캡셀 붕해 기준)

수분 : 10% 이내(내용물 수분)

대장균균 : 음성

<근거_건강기능식품 공전 규격>



2. 임상시험약 제조기록서

2018.09.17

제품명	(위약)녹차EGCG 임상 제품 380mg/전복대									
유형	개별인정형 임상용 제품									
내용량	380mg*98일(12주)* 진약60명(5,880cap/2,234kg)/위약40명(3,920cap)								380 mg	
섭취량	1일1회, 1회 1캡셀 암녹색 경질 캡셀									
제조단위(캡)	단위중량(mg) 포장단위(PTP) 총중량(g) Lot수량(cap) 과량(O/D) 투입수량(Cap) 총중량(g) 성상 및 제형									
	40	380	98	1,489.6	3,920	150%	5,880	2,234	미홍색 분말로 상하부 암록색의 경질캡셀	

1. 성분 및 배합비율

NO	원료명	규격	배합비율	함량(mg)	투입량(g)	과단위	소재량	구매량	재료비	비고
1	결정셀룰로오스	식첨	96.40%	366.32	2,153.96					
2	적색 색소	식첨	3.50%	13.30	78.20					
3	이산화규소	식첨	0.10%	0.38	2.23					
자재	10구 PTP(AL-foil/PVC)						PTP 400판			
	케이스(10판/무지)						40갑			
합 계			100.00%	380.00	2,234.40		이론금액	-	-	
							(Loss 50%)	-	-	

* 제조일자 :

* 유통기간 : 제조일로부터 2년

※ 공정 : 1) 칭량 → 2)체과 → 3)혼합 → 4)체과 → 5)입출중진 → 6)PTP포장 → 7)박스

JIR 전라북도생물산업진흥원
Jeonbuk Institute for Food Technology

2018.09.17

제품명	(진약)녹차EGCG 임상 제품 380mg/전복대									
유형	개별인정형 임상용 제품									
내용량	380mg*98일(12주)* 진약60명(5,880cap/2,234kg)/위약40명(3,920cap)								380 mg	
섭취량	1일1회, 1회 1캡셀 암녹색 경질 캡셀									
제조단위(캡)	단위중량(mg) 포장단위(PTP) 총중량(g) Lot수량(cap) 과량(O/D) 투입수량(포) 총중량(g) 성상 및 제형									
	60	380	98	2,234.4	5,880	170%	9,996	3,798	미홍색분말로 상하부 암록색의 경질캡셀	

1. 성분 및 배합비율

NO	원료명	규격	배합비율	함량(mg)	투입량(g)	과단위	소재량	구매량	재료비	비고
1	녹차(EGCG)추출물	건기식	68.42%	260.00	2,598.92					녹차추출물100%
2	결정셀룰로오스	식첨	31.38%	119.24	1,191.96					
3	카르복시메칠셀룰로오스	식첨	0.10%	0.38	3.80					
4	이산화규소	식첨	0.10%	0.38	3.80					
자재	10구 PTP(AL-foil/PVC)						PTP 600판			
	케이스(10판/무지)						60갑	100갑		진약60갑, 위약40갑
합 계			100.00%	380.00	3,798.48		이론금액	-	-	
							(Loss 50%)	-	-	

* 제조일자 :

* 유통기간 : 제조일로부터 2년

※ 공정 : 1) 칭량 → 2)체과 → 3)혼합 → 4)체과 → 5)입출중진 → 6)PTP포장 → 7)박스

JIR 전라북도생물산업진흥원
Jeonbuk Institute for Food Technology

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플 위약

검토자	승인자
이민영	조대성

제품명	EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플	제품유형	암녹씨의 경질캡셀
제조번호	171024-02	제조일자	2017. 10. 24
생산량	4,000캡슐	포장단위	4.9 PTP/box * 각 80ca씩

1. 칭량 (작업 일시: 2017. 10. 17)

사용 설비	제조 지시 및 방법				작업자	확인자	
저울	◎ 저울의 영점, 수평 등의 상태를 확인 후 사용. ◎ 저울 및 칭량실의 청결상태를 확인한 후 작업.	재료명	배합비 (%)	기준량 (g)	사용량 (g)	이민영	이민영
		정정셀룰로오스	96.4	2472.6	2472.6		
		적색 색소	3.5	89.8	89.8		
		이산화규소	0.1	2.6	2.6		
		합계	100.0	2565.0	2565.0		
비고							

2. 혼합 (작업 일시: 2017. 10. 17)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용			작업자	확인자
소용량 균질 혼합기	◎ 혼합 원료 - 정정셀룰로오스 2,472.6g - 적색색소 89.8g ◎ 작업 조건 - 교반기속도 20rpm - 30분간 실시함.	혼합 원료			이민영	이민영
		원부재료명	기준량(g)	사용량(g)		
		정정셀룰로오스	2,472.6	2,472.6		
		적색 색소	89.8	89.8		
		합계	2562.4	2562.4		
		혼합기 운전내용			이민영	이민영
		작업일시	점검시간	교반기속도		
		2017. 10. 17	10:00	20rpm		
		2017. 10. 17	10:15	20rpm		
		2017. 10. 17	10:30	20rpm		
비고						

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상생물 위약

검토자	승인자
이민하	조대영

3. 건조 (작업 일시 : 2017. 10. 17)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자		
열 풍 건 조 기	◎ 건조 원료 - 건정셀룰로오스 2,472.6g - 적색색소 89.8g ◎ 작업 조건 - 건조 온도 60℃ - 30분간 실시함.	건조 원료	조대영	이민하		
		원부재료명			기준량(g)	사용량(g)
		결정셀룰로오스			2472.6	2,472.6
		적색 색소			89.8	89.8
		합 계	2,562.4	2,562.4		
		건조기 운전내용				
		작업일시	점검시간	건조 온도	조대영	이민하
		2017.10.17	13:00	60℃		
		2017.10.17	14:00	60℃		
		2017.10.17	15:00	60℃		
2017.10.17	16:00	60℃				
2017.10.17	17:00	60℃				
비고						

4. 후혼합 (작업 일시 : 2017.10.18)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자		
소 용 당 균 질 혼 합 기	◎ 혼합 원료 - 건조된 결정셀룰로오스, 적색색소 혼합물 2,562.4g - 이산화규소 2.6g ◎ 작업 조건 - 교반기속도 20rpm - 30분간 실시함.	혼합 원료	조대영	이민하		
		원부재료명			기준량(g)	사용량(g)
		건조 혼합물			2562.4	2,562.4
		이산화규소			2.6	2.6
		합 계	2565	2,565		
		혼합기 운전내용				
		작업일시	점검시간	교반기속도	조대영	이민하
		2017.10.18	10:00	20 rpm		
		2017.10.18	10:15	20 rpm		
		2017.10.18	10:30	20 rpm		
비고						

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플 위약

검 토 자	승 인 자
이민영	김대중

5. 총 진 (작업 일시 : 2017. 10. 18)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용					작업자	확인자		
		확인 횟수	개별중량(mg)						평균 중량 (mg)	
캡 셀 중 진 기	◎ 중진조건 - 불투명한 0호의 압축세 캡셀 사용 - 개별중량(1cap) 380mg±3% : 368mg ~ 392 mg - 평균중량(10cap) 3,800mg±3% : 3,680mg ~ 3,920mg - 캡셀뚜껑 닫힘 상태 확인	1	375	382	381	375	382	3801	이민영	
			376	384	386	376	384			
		2	391	386	385	391	386	3845		
			396	384	386	376	384			
		3	385	399	398	386	399	3830		
			389	385	380	389	386			
		4	391	386	385	391	386	3863		
			384	385	386	384	386			
		5	396	386	386	396	384	3890		
			384	385	386	384	386			
		비고								

6. 선 별 (작업 일시 : 2017. 10. 19)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
캡 셀 선 별 기	◎ 선별조건 - 이물질 확인 - 캡셀상태확인(눌림,깨짐) - 캡셀뚜껑 닫힘상태 확인	- 캡셀뚜껑 상태 확인 - 이물질 확인 - 캡셀뚜껑 닫힘상태 확인	이민영	김대중
비고				

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상생물 위약

검 토 자	승 인 자
이명희	김재중

7. PTP포장 (작업 일시 : 2017.10.20)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
브 리 스 터 포 장 기	◎ PTP 포장조건 - 10개 캡셀씩 포장 - 이물질 확인 - 캡슐상태 확인 - 접착상태확인 - 400개 수량 생산(위약)	- 10캡셀 / 1 PTP 포장 - 400 PTP 생산	김재중	이명희
비고				

8. Box포장 (작업 일시 : 2017.10.24)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
-	◎ BOX 포장조건 - 1차분, 2차분 각각 40박스 포장	1차분 : 42인 + 여백 7인 포장하여 49캡셀 1box이 가능. 2차분 : 42인 + 여백 9인 포장하여 49캡셀 1box이 가능	김재중	이명희
비고				

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플

검토자	승인자
이재영	김대중

붙임. 제조 사진



칭량



혼합



충진



선별



PTP포장



Box포장

제 품 시 험 성 적 서

ANALYTICAL REPORT OF PRODUCTS

제 품 명 PRODUCT NAME	"EGCG 고함유 녹차추출물" 위약		
제 조 번 호 LOT NO.	171024-02	시 험 번 호 ANALYSIS NO.	P-201711-02
제 조 수 량 LOT SIZE	4,000 Cap	시 험 일 자 ANALYSIS DATE	2017. 11. 01.
제 조 일 자 MFD.DATE	2017. 10. 24.	시 험 방 법(규격) ANALYSIS METHODS	식품공전

시 험 항 목 TEST ITEMS	시 험 기 준 SPECIFICATIONS	시 험 결 과 RESULTS	시 험 자 TESTED BY
성 상	연황색분말로 암녹색경질캡셀	적 합	한금철
수 분	10 % 이내	(8.7 ± 0.1) %	한금철
증 량 편 차	380 mg ± 10 %	적 합	한금철
대 장 균 균	음 성	음 성	이미선
붕 해 시 험	20 분 이내 (이하여백)	적 합	한금철

판정결과 Results	확인 Checked by	승인 Approved by	승인일자 Date
적합	한금철	주지현	2017. 11. 6

STD-QC0201-F04

전라북도생물산업진흥원
Jeonbuk Institute for Food Bioindustry

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상생물 진약

검토자	승인자
이민영	조대성

제품명	EGCG고함유 녹차추출물 임상생물	제품유형	암녹색의 정질캡슐
제조번호	171024-01	제조일자	2017. 10. 24
생산량	4,000캡슐	포장단위	4.9 PTP/box * 각 80ea씩

1. 칭량 (작업 일시 : 2017. 10. 19)

사용 설비	제조 지시 및 방법					작업자	확인자
저울 ◎ 저울의 영점, 수평 등의 상태를 확인 후 사용. ◎ 저울 및 칭량실의 청결상태를 확인한 후 작업.	재료명	배합비 (%)	기준량 (g)	사용량 (g)	조대성	이민영	
	녹차추출물	10.0	1282.5	1282.5			
	정질셀룰로오스	49.8	1291.3	1291.3			
	CMC Ca	0.1	2.6	2.6			
	이산화규소	0.1	2.6	2.6			
합계	100	2565.0	2565.0				
비고							

2. 혼합 (작업 일시 : 2017. 10. 19)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용			작업자	확인자
소용량 균질 혼합기 ◎ 혼합 원료 - 녹차추출물(1,282.5g) - 정질셀룰로오스(1,277.3g) - CMC Ca(2.6g) - 이산화규소(2.6g) ◎ 작업 조건 - 교반기속도 20rpm - 30분간 실시함		혼합 원료			조대성	이민영
		원부재료명	기준량(g)	사용량(g)		
		녹차추출물	1282.5	1282.5		
		정질셀룰로오스	1291.3	1291.3		
		CMC Ca	2.6	2.6		
		이산화규소	2.6	2.6		
		합계	2565.0	2565.0		
		혼합기 운전내용			조대성	이민영
		작업일시	점검시간	교반속도		
		2017. 10. 19	10:00	20rpm		
2017. 10. 19	10:15	20rpm				
2017. 10. 19	10:30	20rpm				
비고						

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상생물 진약

검 토 자	승 인 자
<i>이민</i>	<i>김태경</i>

3. 총 진 (작업 일시 : 2019. 10. 19)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용					작업자	확인자	
		확인 횟수	개별중량(mg)						평균 중량 (mg)
캡셀 총 진 기	① 총진조건 - 불투명한 0호의 암녹색 캡셀 사용 - 개별중량(1cap) 380mg±3% : 368mg ~ 392 mg - 평균중량(10cap) 3,800mg±3% : 3,680mg ~ 3,920mg - 캡셀뚜껑 닫힘 상태 확인	1	395	390	381	395	380	3,780	김태경 이민
			396	396	380	395	394		
		2	385	385	384	396	381	3,814	
			396	396	399	395	399		
		3	385	385	388	389	381	3,838	
			389	389	380	389	381		
		4	388	388	380	389	389	3,819	
			389	380	386	386	388		
		5	385	396	381	380	389	3,823	
			381	381	380	389	385		
		비고							

4. 선 별 (작업 일시 : 2019. 10. 20)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
캡셀 선 별 기	① 선별조건 - 이물질 확인 - 캡셀상태확인(눌림, 깨짐) - 캡셀뚜껑 닫힘 상태 확인	· 캡셀 상태 선별 · 이물질 선별 · 선별 후 개량률 실시	김태경	이민
비고				

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플 진약

검토자	승인자
이민영	김대영

5. PTP포장 (작업 일시 : 2019. 10. 23)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
브리 스터 포 장 기	◎ PTP 포장조건 - 10개 캡셀씩 포장 - 이물질 확인 - 캡슐상태 확인 - 검착상태확인 - 400개 수량 생산(진약)	· 10캡슐 / 1 PTP 포장상자 · 415 PTP 생산	차현경	이민영
비고				

6. Box포장 (작업 일시 : 2019. 10. 23)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
	◎ BOX 포장조건 - 1차분, 2차분 각각 40박스 포장	· 1차분 : 400mg + 17% 여량분 포장하여 49캡슐 1 box에 포장 · 2차분 : 400mg + 17% 여량분 포장하여 49캡슐 1 box에 포장	차현경	이민영
비고				

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플

검토자	승인자
이재경	김대영

붙임, 제조 사진



칭량



혼합



충진



선별



PTP포장



Box포장

제 품 시 험 성 적 서

ANALYTICAL REPORT OF PRODUCTS

제 품 명 PRODUCT NAME	"EGCG 고탐유 녹차추출물" 진약		
제 조 번 호 LOT NO.	171024-01	시 험 번 호 ANALYSIS NO.	P-201711-01
제 조 수 량 LOT SIZE	4,000 Cap	시 험 일 자 ANALYSIS DATE	2017. 11. 01.
제 조 일 자 MFD.DATE	2017. 10. 24.	시 험 방 법(규격) ANALYSIS METHODS	식품공전

시 험 항 목 TEST ITEMS	시 험 기 준 SPECIFICATIONS	시 험 결 과 RESULTS	시 험 자 TESTED BY
성 상	연화색분말로 압축색경질캡셀	적 합	한금철
수 분	10 % 이내	(5.8 ± 0.1) %	한금철
중 량 편 차	380 mg ± 10 %	적 합	한금철
대 장 균 균	음 성	음 성	이미선
봉 해 시 험	20 분 이내 (이하여백)	적 합	한금철

판정결과 Results 적합	확인 Checked by 한금철	승인 Approved by 김이현	승인일자 Date 2017. 11. 8
------------------------	--------------------------	---------------------------	------------------------------

STD-QC0201-F04

JIF 전라북도생물산업진흥원
Jeonbuk Institute for Food Biaindustry

제9절 피부주름억제 전임상시험 및 작용기전 연구

1. In vitro에서 EGCG의 주름억제 및 보습증진에 관한 작용기전연구

가. DPPH 소거능에 의한 항산화 활성

EGCG (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)농도에서 측정된 결과 EGCG에서 65 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이상에서 전자공여능이 50% 이상이었고, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 EGCG의 전자공여능이 72.1% 이상으로 농도 의존적으로 나타내었다 (Fig. 1).

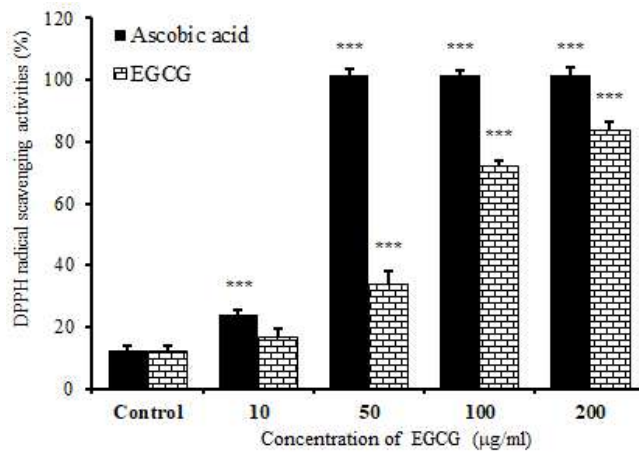


Fig. 1. DPPH radical scavenging activities of water extracts from *EGCG*. DPPH solution were pre-mixed with EGCG and ascorbic acid (10, 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or vehicle (CT). Values are the means \pm standard error of three determinations. Same letters within same concentration represent no significant difference at $***P < 0.001$ vs control (CT).

나. Collagenase 활성도 저해 효과

EGCG에 대한 collagenase 저해활성을 측정된 결과, 약 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 IC_{50} 의 저해활성을 나타내었다(Fig. 2).

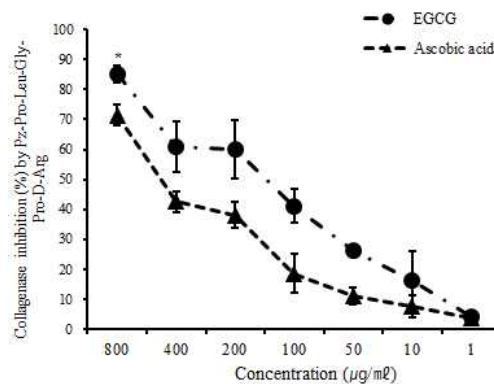


Fig. 2. Effects of EGCG and ascorbic acid on collagenase inhibition. EGCG and ascorbic acid were tested for the inhibitory effect of collagenase activity using 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl -Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg as the substrate. Collagenase inhibition % at each concentration (800, 400, 200, 100, 50, 25, 10, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) values represent mean \pm S.E (N=3) of the three groups. Statistically significant values were compared with control group data by T-test (***) $p < 0.001$).

다. HaCat 세포주에서 EGCG의 피부주름 개선에 미치는 효과

(1) 세포생존 능력

EGCG에 대한 HaCaT 세포주의 세포독성을 확인한 결과, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았다 (Fig. 4).

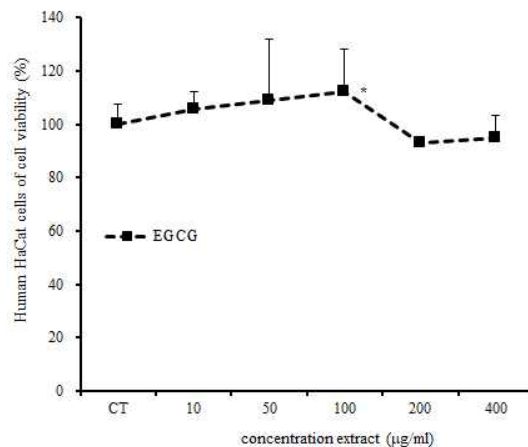


Fig. 3. Effect of EGCG on cell viability in HaCaT cell line.

HaCaT cells were pre-treated with EGCG (10, 50, 100, 200, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or vehicle (CT) for 24 h. MTT assay was carried out to check the cytotoxic effect of HaCaT cell line. Each bar graph represents mean \pm (SE) of at least 3 independent experiments.

* $P < 0.05$.

(2) MMP-1 mRNA 발현에 대한 영향

EGCG에 의한 MMP-1 mRNA 발현은 대조군 (TI-CT)에 비하여 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 40% 이상 유의성 있게 MMP-1 mRNA 유전자 발현을 억제하였다. 그러나 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서는 대조군 (TI-CT)에 비하여 약 20% 이상 있게 MMP-1 mRNA 유전자 발현을 억제하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 5).

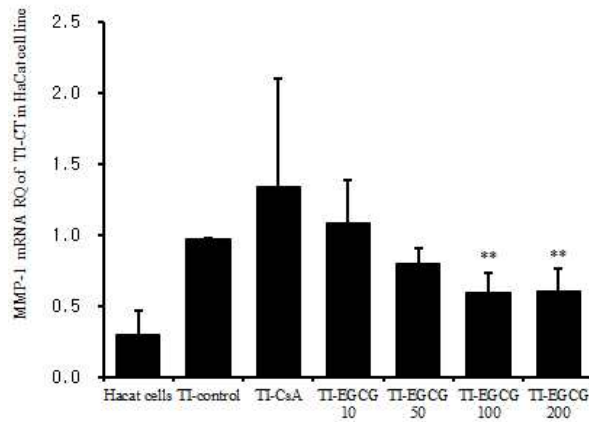


Fig. 4. Effects of EGCG on MMP-1 mRNA expression in HaCaT cells. HaCaT cells were incubated with TNF- α +IFN-g (10 ng/mL) in EGCG (10, 50, 100, and 200 μ g/ml) for 24 hr. The expression of MMP-1 mRNA levels in each sample was analyzed by real-time PCR and the relative quantities (RQ) of MMP-1 mRNA was normalized to the quantity of GAPDH. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Values are expressed as means \pm S.E. from two-independent experiments(** p<0.01).

(3) MMP-9 mRNA 발현에 대한 영향

EGCG에 의한 MMP-9 mRNA 발현은 대조군 (TI-CT)에 비하여 100 μ g/ml, 200 μ g/ml 농도에서 각각 17%, 22% 이상 유의성 있게 MMP-9 mRNA 유전자 발현을 억제하였다. 그러나 10, 50 μ g/ml 농도에서는 대조군 (TI-CT)과 차이가 없었다 (Fig. 6).

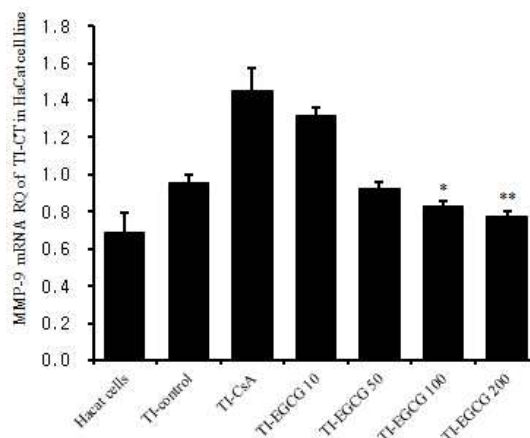


Fig. 5. Effects of EGCG on MMP-9 mRNA expression in HaCaT

cells. HaCaT cells were incubated with TNF- α +IFN- γ (10 ng/mL) in EGCG (10, 50, 100, and 200 μ g/ml) for 24 hr. The expression of MMP-9 mRNA levels in each sample was analyzed by real-time PCR and the relative quanyitatives (RQ) of MMP-1 mRNA was normalized to the quantity of GAPDH. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Values are expressed as means \pm S.E. from two-independent experiments(*p<0.05, ** p<0.01).

(4) MMP-13 mRNA 발현에 대한 영향

EGCG에 의한 MMP-13 mRNA 발현은 대조군 (TI-CT)에 비하여 50 μ g/ml, 100 μ g/ml, 200 μ g/ml 농도에서 각각 17%, 32%, 38% 이상 유의성 있게 MMP-13 mRNA 유전자 발현을 억제하였다. 그러나 10 μ g/ml 농도에서는 대조군 (TI-CT)과 차이가 없었다 (Fig. 7).

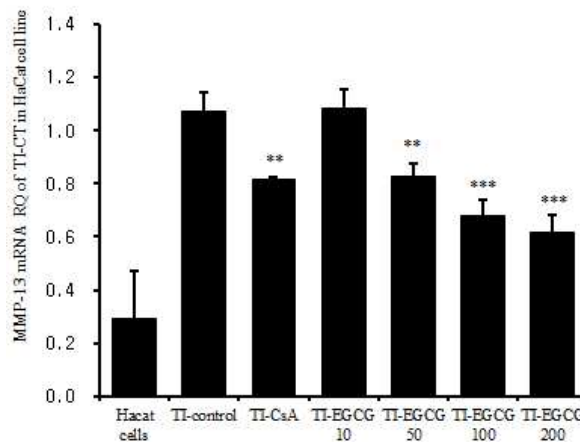


Fig. 6. Effects of EGCG on MMP-13 mRNA expression in HaCaT cells. HaCaT cells were incubated with TNF- α +IFN-g (10 ng/mL) in EGCG (10, 50, 100, and 200 μ g/ml) for 24 hr. The expression of MMP-13 mRNA levels in each sample was analyzed by real-time PCR and the relative quanyitatives (RQ) of MMP-13 mRNA was normalized to the quantity of GAPDH. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Values are expressed as means \pm S.E. from two-independent experiments(** p<0.01, *** p<0.001).

(5) 염증사이토카인 IL-6 발현에 대한 영향

EGCG에 의한 염증사이토카인 IL-6 mRNA 발현은 대조군 (TI-CT)에 비하여 100 µg/ml, 200 µg/ml 농도에서 각각 21%, 31% 이상 유의성 있게 억제하였다. 그러나 10, 50 µg/ml 농도에서는 대조군 (TI-CT)에 비하여 IL-6 mRNA 유전자 발현을 억제하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 8).

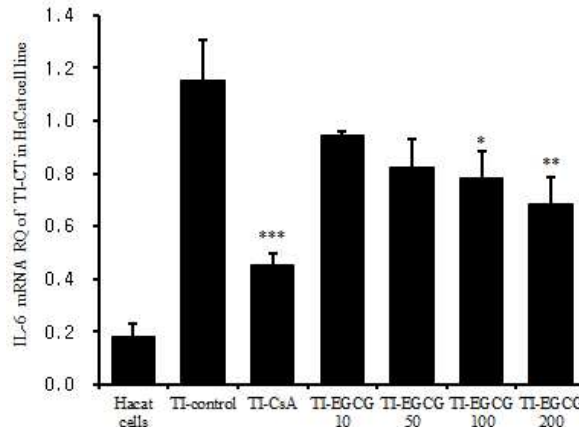


Fig. 7. Effects of EGCG on proinflammatory IL-6 mRNA expression in HaCaT cells. HaCaT cells were incubated with TNF- α +IFN-g (10 ng/mL) in EGCG (10, 50, 100, and 200 µg/ml) for 24 hr. The expression of proinflammatory IL-6 mRNA levels in each sample was analyzed by real-time PCR and the relative quanyitatives (RQ) of IL-6 mRNA was normalized to the quantity of GAPDH. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Values are expressed as means \pm S.E. from two-independent experiments(*p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001).

(6) 염증사이토카인 TNF- α 발현에 대한 영향

EGCG에 의한 염증사이토카인 TNF- α mRNA 발현은 대조군 (TI-CT)에 비하여 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml 농도에서 각각 20%, 18%, 30%이상 유의성 있게 TNF- α mRNA 유전자 발현을 억제하였다. 그러나 10 µg/ml 농도에서는 대조군 (TI-CT)과 차이가 없었다 (Fig. 9).

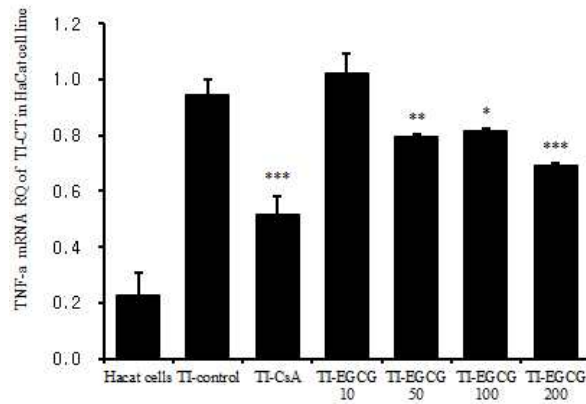


Fig. 8. Effects of EGCG on proinflammatory TNF- α mRNA expression in HaCaT cells. HaCaT cells were incubated with TNF- α +IFN-g (10 ng/mL) in EGCG (10, 50, 100, and 200 μ g/ml) for 24 hr. The expression of proinflammatory TNF- α mRNA levels in each sample was analyzed by real-time PCR and the relative quantities (RQ) of TNF- α mRNA was normalized to the quantity of GAPDH. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Values are expressed as means \pm S.E. from two-independent experiments(*p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001).

(7) MMP-1 ELISA 측정

EGCG의 주름개선 효과를 관찰한 결과로, HaCaT 각질세포주에서 TNF- α +IFN- γ 대조군(TI-CT) MMP-1 단백질 발현이 33.1 ± 4.87 (ng/ml)로 정상군 5.71 ± 1.22 (ng/ml)에 비하여 5배 이상 증가하였다. EGCG에 의한 MMP-1 단백질 발현은 대조군 (TI-CT)에 비하여 100 μ g/ml, 200 μ g/ml 농도에서 각각 45.0%, 52.8% 이상 유의성 있게 MMP-1 단백질 발현을 억제하였다. 그러나 50 μ g/ml 농도에서는 대조군 (TI-CT)에 비하여 약 30.5% 이상 MMP-1 단백질 발현을 억제하였으나 유의성은 없었다 (Fig. 10).

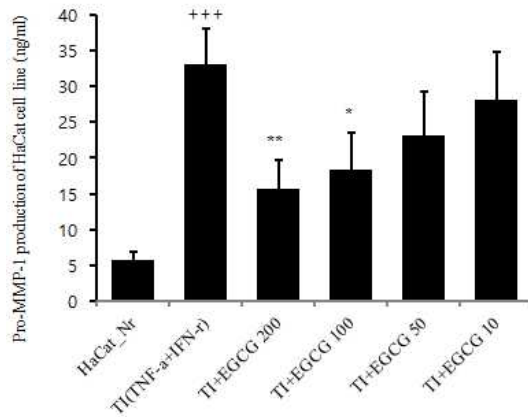


Fig. 9. HaCaT keratinocytes were stimulated by tumor necrosis factor (TNF)- α +IFN- γ to produce matrix metalloproteinases (MMP)-1. HaCaT cells were incubated with TNF- α +IFN- γ (10 ng/mL) in EGCG (10, 50, 100, and 200 μ g/ml) for 48hrs. The supernatant was collected after 48 h and subjected to enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). MMP-1 was secreted into the supernatant and induced significantly by TNF- α +IFN- γ in HaCaT keratinocytes. Values are expressed as means \pm S.E. from two-independent experiments (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

(8) MMP-1 단백질의 western blot 분석

HaCaT 각질 세포주에서 TNF- α +IFN- γ 대조군(TI-CT) MMP-1 단백질 발현의 BD값이 55.3 (band density, BD)로 정상군 BD값이 4.5에 비하여 12배 이상 증가하였다. EGCG에 의한 MMP-1 단백질 발현은 대조군 (TI-CT)에 비하여 200 μ g/ml, 100 μ g/ml 농도에서 각각 82.0%, 82.4% 이상 MMP-1 단백질 발현을 현저하게 억제하였다. 그리고 50 μ g/ml 농도에서는 대조군 (TI-CT)에 비하여 약 43.5% 이상 MMP-1 단백질 발현을 억제하였다 (Fig. 11).

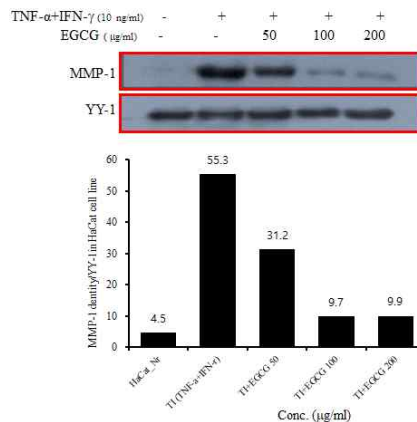


Fig. 10. Effect of EGCG on TNF- α +IFN- γ -induced MMP-1

protein expressions in HaCaT cells. HaCaT cells were incubated with TNF- α + IFN- γ (10 ng/mL) in EGCG (10, 50, 100, and 200 μ g/ml) for 24 h. To investigate effect of 70% ethanol extracts, HaCaT cells were stimulated with TNF- α + IFN- γ (10 ng/mL) and the indicated concentrations of nutmeg and husk extract for 24 h. The cell lysates were analyzed by Western blotting with anti-MMP-1, anti-YY-1. Anti-YY-1 was used as control.

2. EGCG의 Hos:HR-1 생쥐에 UVB조사로 유발한 주름생쥐동물모델에서 항주름 동물효능 평가

가. HR-1 생쥐의 상피조직 두께 및 피부 콜라겐 섬유(collagen fiber) 변화에 미치는 영향

EGCG에 대한 피부 주름개선 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 8주 후 등피부조직을 H&E 염색을 하여 현미경 상에서 상피조직 두께를 측정한 결과다. 그 결과 Fig. 1, 2 에서처럼 정상군 (Fig. 3)에 비하여 UVB_대조군 (Fig. 5)이 4배 이상 상피조직 두께가 두꺼워 졌다. 그리고 retinoic acid (Fig. 7), EGCG 100 mg/kg (Fig. 9), 그리고 EGCG 50 mg/kg (Fig. 11) 투여군의 상피조직 두께가 대조군 (UVB_vehicle)에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$). 그리고 Fig. 2는 피부 주름개선 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 8주 후 등피부조직을 Masson's trichrome 염색을 하여 현미경 상에서 콜라겐 섬유(collagen fiber) 변화를 측정한 결과다. 그 결과 Fig. 4, 6, 8, 10, 12 에서처럼 정상대조군 (Fig. 4)에 비하여 UVB_대조군 (Fig. 6)이 M-T 염색의 강도가 현저하게 감소된 것으로 보아 콜라겐 섬유(collagen fiber)의 분해가 크게 진행되어 주름 형성이 가속된 것으로 생각되는 결과이다. 그리고 retinoic acid (Fig. 8), EGCG 100 mg/kg (Fig. 10), 그리고 EGCG 50 mg/kg (Fig. 12) 투여군의 콜라겐 섬유(collagen fiber)의 양이 대조군 (UVB_vehicle)에 비하여 증가된 것을 알 수 있었고, 이러한 결과로 주름개선이 되었다고 생각된다.

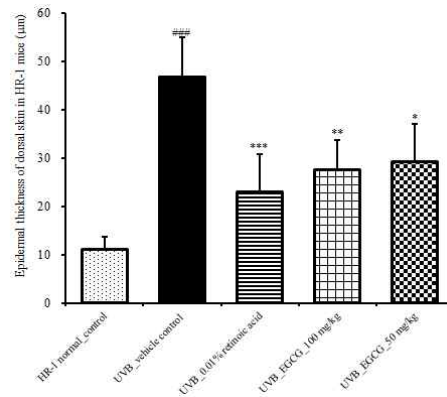


Fig. 1. Inhibition of skin thickening by EGCG and retinoic acid on epidermis induced by UVB irradiation. Hematoxylin and eosin (H&E) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 100x.

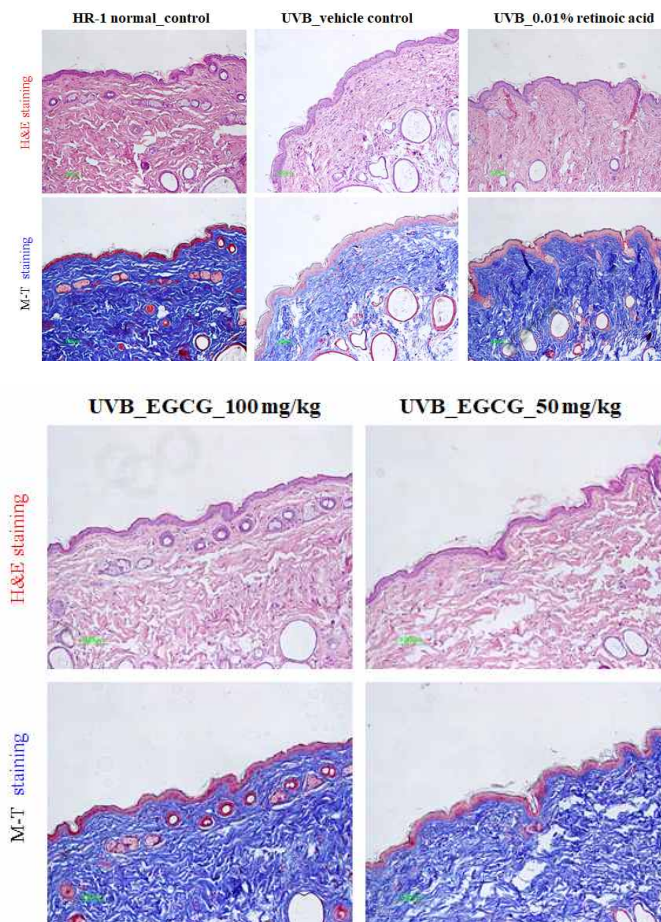


Fig. 2. Histology of dorsal skin by EGCG and retinoic acid on epidermis induced by UVB irradiation. Hematoxylin and eosin (H&E) staining and Masson's Trichrome(M-T) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 100x.

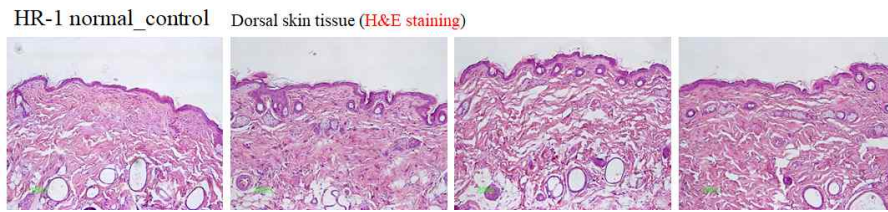


Fig. 3. HR-1 hairless male mice dorsal skin. HR-1 hairless male mice dorsal skin of Hematoxylin and eosin (H&E) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 100x.

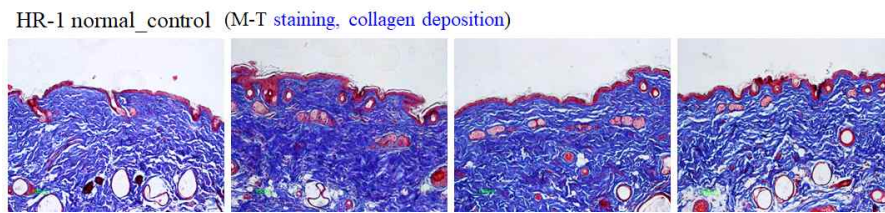


Fig. 4. HR-1 hairless male mice dorsal skin. HR-1 hairless male mice dorsal skin of Masson's Trichrome (M-T) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 200x.

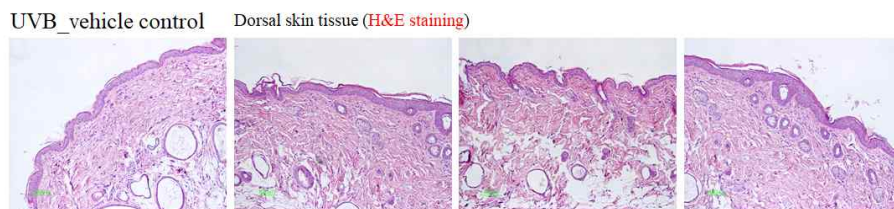


Fig. 5. Inhibition of skin thickening by vehicle control on epidermis induced by UVB irradiation. HR-1 hairless male mice dorsal skin of Hematoxylin and eosin (H&E) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 100x.

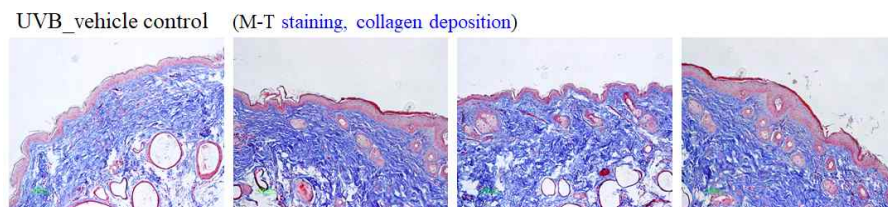


Fig. 6. Inhibition of collagen deposition by vehicle control on epidermis induced by UVB irradiation. HR-1 hairless male mice dorsal skin of Masson's Trichrome (M-T) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 100x.

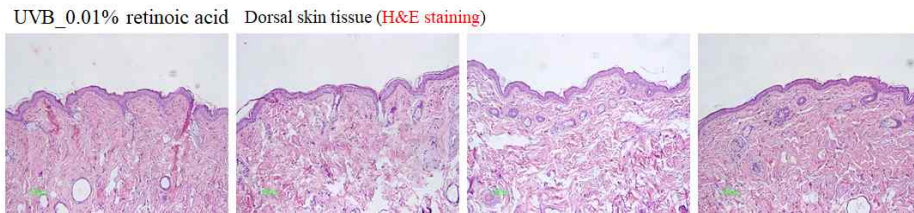


Fig. 7. Inhibition of skin thickening by 0.01% retinoic acid on epidermis induced by UVB irradiation. HR-1 hairless male mice dorsal skin of Hematoxylin and eosin (H&E) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 100x.

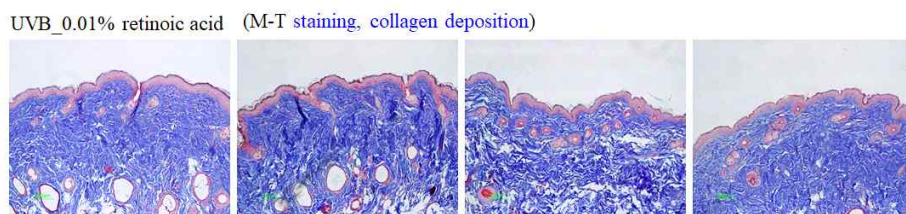


Fig. 8. Inhibition of collagen deposition by 0.01% retinoic acid on epidermis induced by UVB irradiation. HR-1 hairless male mice dorsal skin of Masson's Trichrome (M-T) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 100x.

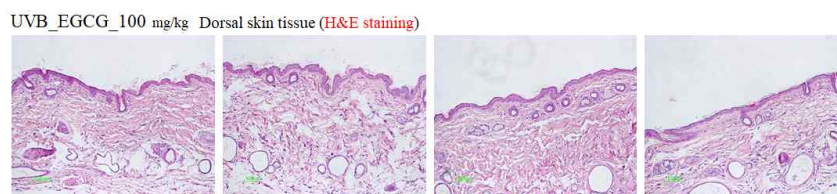


Fig. 9. Inhibition of skin thickening by EGCG 100mg/kg on epidermis induced by UVB irradiation. HR-1 hairless male mice dorsal skin of Hematoxylin and eosin (H&E) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 100x.

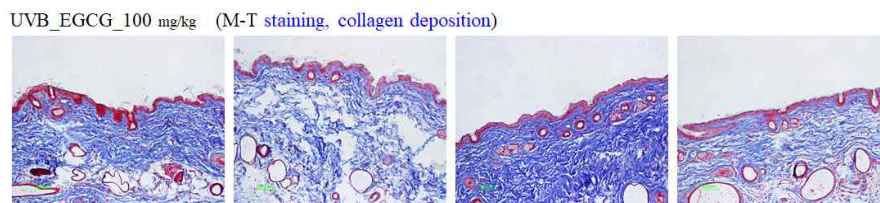


Fig. 10. Inhibition of collagen deposition by EGCG 100mg/kg on epidermis induced by UVB irradiation. HR-1 hairless male mice dorsal skin of Masson's Trichrome (M-T) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 100x.

UVB_EGCG_50 mg/kg Dorsal skin tissue (H&E staining)

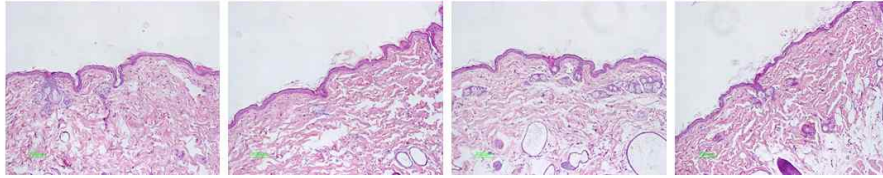


Fig. 11. Inhibition of skin thickening by EGCG 50mg/kg on epidermis induced by UVB irradiation. HR-1 hairless male mice dorsal skin of Hematoxylin and eosin (H&E) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 100x.

EGCG 50 mg/kg (M-T staining, collagen deposition)

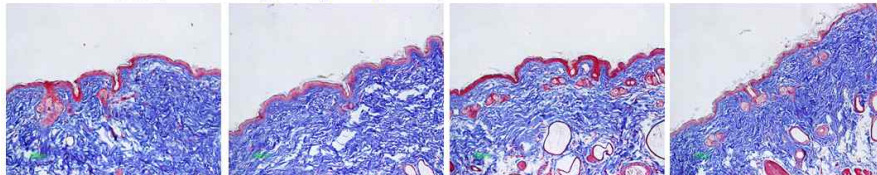


Fig. 12. Inhibition of collagen deposition by EGCG 50mg/kg on epidermis induced by UVB irradiation. HR-1 hairless male mice dorsal skin of Masson's Trichrome (M-T) staining of UVB-irradiated hairless mice skin. Original magnification 100x

나. HR-1 생쥐의 주름 측정 (Dermobella) 분석

EGCG에 대한 등피부 주름깊이 (wrinkle depth) 개선 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 광노화를 유도한 다음 4주 후 등피부 주름깊이를 skin dermobella 3D 분석기로 등주름 깊이를 UVB조사 4주, 6주, 8주, 10주에 측정 하였다(Fig. 1, Fig. 14~33). 그 결과 4주, 6주, 8주, 10주에서 정상대조군에 비하여 UVB_대조군의 등피부사진을 분석하여 UVB광노화로 주름형성 및 깊이가 현저하게 증가된 결과이다. 그리고 UVB 조사 4주, 6주, 8주, 10주 후에 EGCG 100 mg/kg, EGCG 50 mg/kg 투여로 등피부 주름형성 및 깊이가 대조군 (UVB_vehicle)에 비하여 현저하게 감소된 것을 알 수 있었고, 이러한 결과로 광노화로 유발되는 주름형성이 EGCG 100 mg/kg, 50 mg/kg에 의하여 개선 효과가 있는 것으로 생각된다.

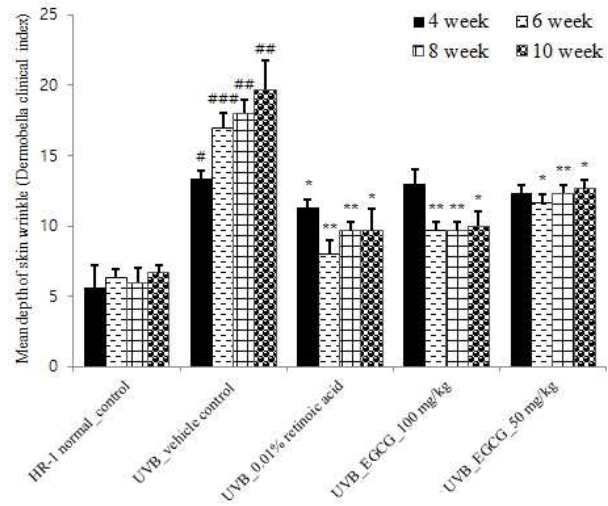


Fig. 13. Analysis of skin dermobella taken from the dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation. Effects of EGCG and retinoic acid on UVB-induced mean depth of skin wrinkle. Values are means \pm S.E.M. for 3 mice. *Significantly different from UVB/vehicle control treatment ($p < 0.05$). **Significantly different from UVB/vehicle control treatment ($p < 0.01$). # : $p < 0.05$, ## : $p < 0.01$, ### : $p < 0.001$ compared with normal group.

Wrinkles/Dermobella (1st): HR-1 normal_control

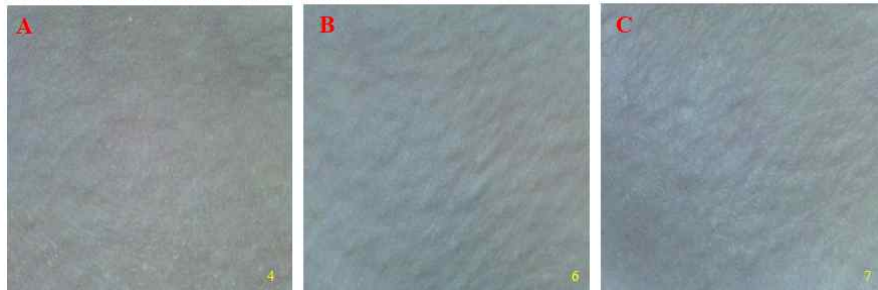


Fig. 14. HR-1 hairless male mice dorsal skin on wrinkle photograph (4 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (1st): UVB_vehicle control



Fig. 15. Effects of vehicle control on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (4 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Dermobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (1st): UVB_0.01%retinoic acid (PC)



Fig. 16. Effects of retinoic acid on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (4 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Dermobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (1st): UVB_EGCG 100mg/kg



Fig. 17. Effects of EGCG 100mg/kg on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (4 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Dermobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (1st): UVB_EGCG 50mg/kg



Fig. 18. Effects of EGCG 100mg/kg on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (4 week). HR-1 hairless male mice

dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (2^{5th}): HR-1 normal_control



Fig. 19. HR-1 hairless male mice dorsal skin on wrinkle photograph (6 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (2^{5th}): UVB_vehicle control



Fig. 20. Effects of vehicle control on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (6 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (2^{5th}): UVB_0.01% retinoic acid (PC)



Fig. 21. Effects of retinoic acid on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (6 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (2st): UVB_EGCG 100mg/kg



Fig. 22. Effects of EGCG 100mg/kg on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (6 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (2st): UVB_EGCG 50mg/kg

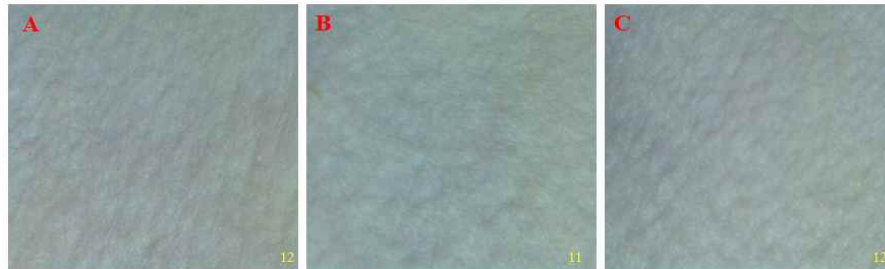


Fig. 23. Effects of EGCG 50mg/kg on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (6 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (3st): HR-1 normal_control

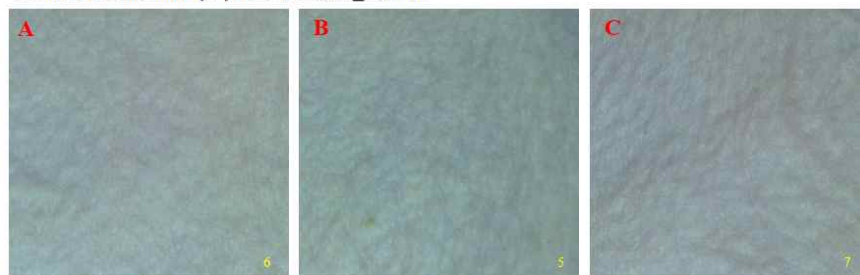


Fig. 24. HR-1 hairless male mice dorsal skin on wrinkle photograph (8 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (3st): UVB_vehicle control

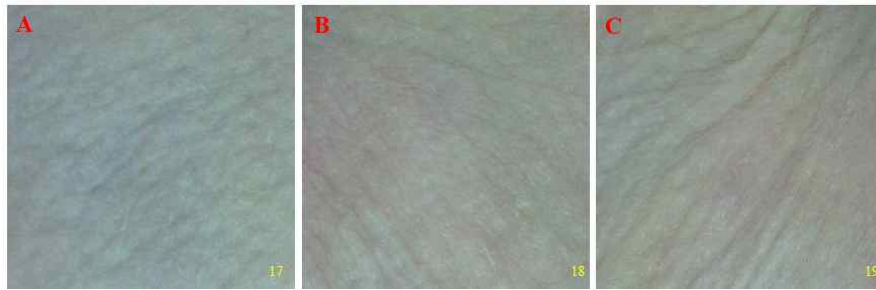


Fig. 25. Effects of vehicle control on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (8 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (3st): UVB_0.01% retinoic acid (PC)

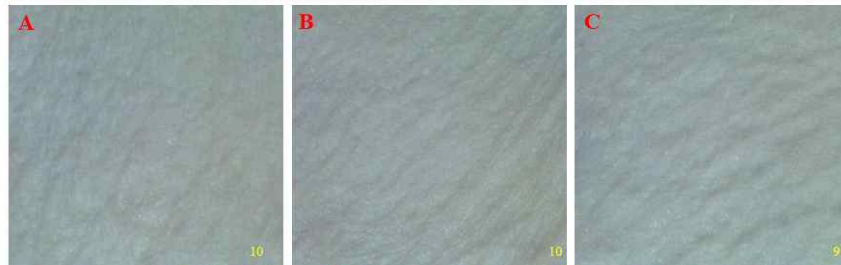


Fig. 26. Effects of retinoic acid on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (8 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (3st): UVB_EGCG 100mg/kg

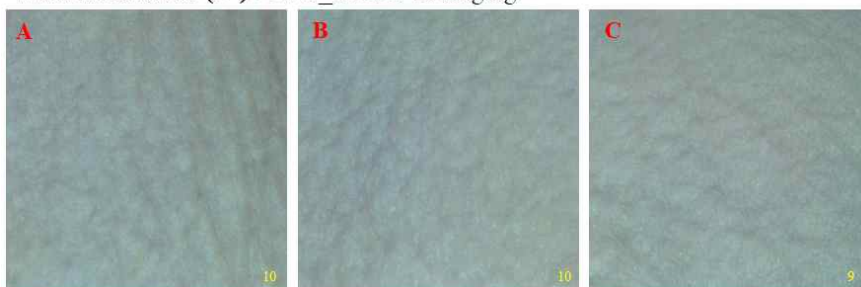


Fig. 27. Effects of EGCG 100mg/kg on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (8 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (3st): UVB_EGCG 50mg/kg



Fig. 28. Effects of EGCG 50mg/kg on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (8 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (Final): HR-1 normal_control

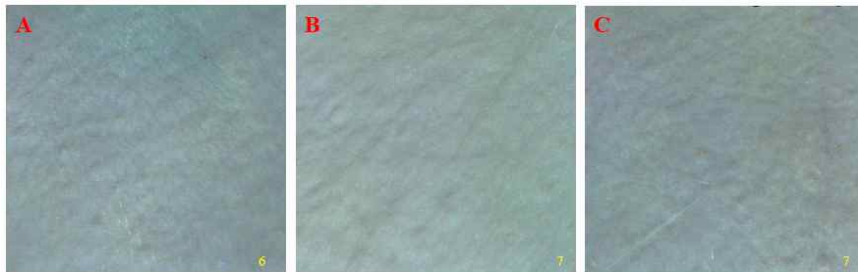


Fig. 29. HR-1 hairless male mice dorsal skin on wrinkle photograph (10 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (Final): UVB_vehicle control



Fig. 30. Effects of vehicle control on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (10 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (Final): UVB_0.01% retinoic acid (PC)

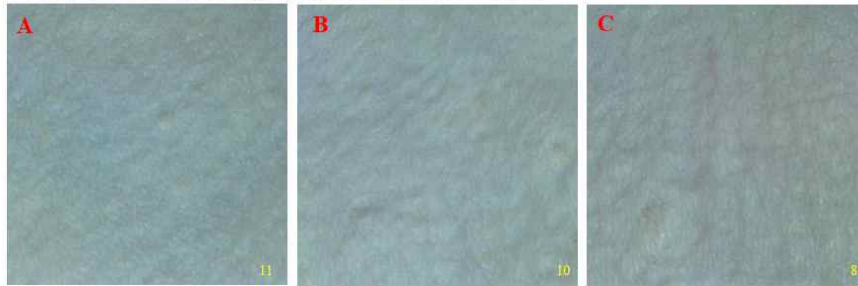


Fig. 31. Effects of retinoic acid on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (10 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (Final): UVB_EGCG 100mg/kg

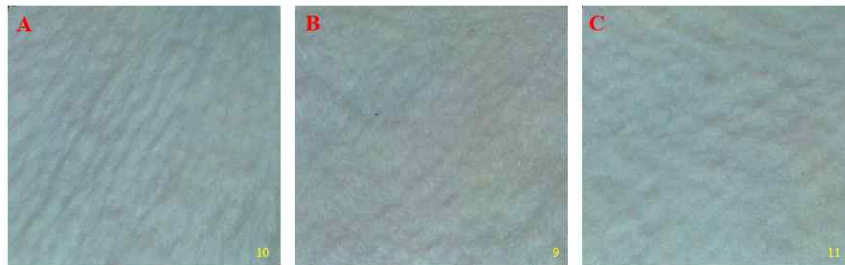


Fig. 32. Effects of EGCG 100mg/kg on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (10 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

Wrinkles/Dermobella (Final): UVB_EGCG 50mg/kg

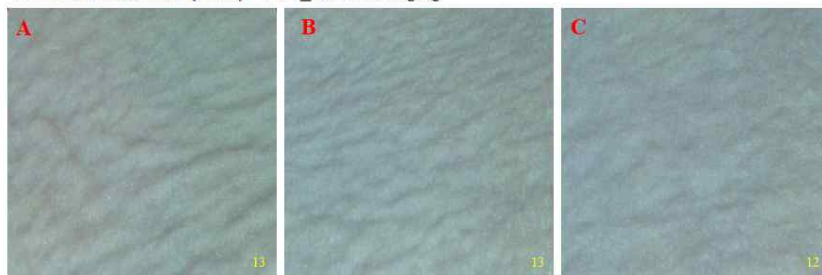


Fig. 33. Effects of EGCG 50mg/kg on UVB-induced wrinkle photograph in hairless mice (10 week). HR-1 hairless male mice dorsal skin (A) ~ (C). Photographs of Demobella were taken from dorsal skin of hairless mice after UVB-irradiation.

다. EGCG의 UVB조사를 통한 체중증가량 및 식이효율에 미치는 영향

(1) 체중변화

EGCG에 대한 피부 주름개선 효과 및 체중변화를 측정하기 위해

HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 매주 체중변화를 측정 한 결과, EGCG에 대한 체중변화는 HR-1 생쥐에 UVB를 조사와 관계없이 그룹 간 큰 변화는 나타나지 않았다 (Fig. 34).

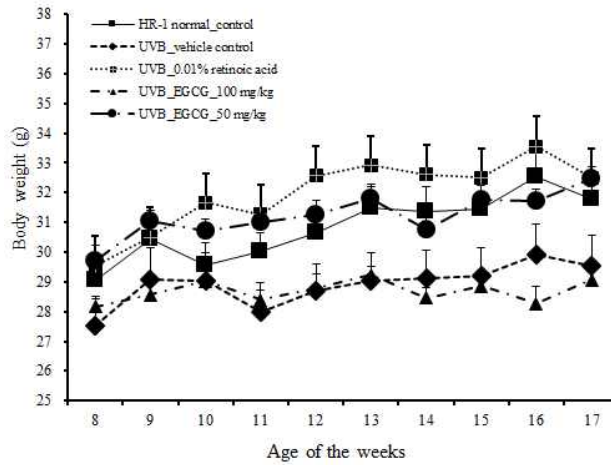


Fig. 34. Change of body weight.

(2) 식이 섭취 및 식이 효율(FER%)

EGCG에 대한 식이섭취 및 식이효율 변화를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 10주 후 측정 한 결과, 정상대조군인 (normal control)군 비해 UVB-대조군 (vehicle control)에서 식이섭취량 및 식이효율이 감소하였지만 유의성은 나타나지 않았다. EGCG처리군은 UVB-대조군 (vehicle control)에 비해 식이섭취량이 증가하였고, 식이효율은 EGCG 50 mg/kg 투여군에서 UVB-대조군 (vehicle control)에 비해 유의성 있게 증가하였다 (Table.1) (Fig. 35).

Table 1. Food intake, body weight gain, and food efficiency ratio of photoprotective and anti-skin aging activities of retinoic acid, and EGCG bar during administration for 10 weeks

Group	Food intakes (g/day)	Body weight gain (g/day)	Food efficiency ratio (FER, %)
HR-1 normal_control	3.25	0.053±0.02	1.2±0.56
UVB_vehicle control	2.83	0.029±0.01	1.03±0.42
UVB_0.01% retinoic acid	3.29	0.042±0.02	1.29±0.62
UVB_EGCG_100 mg/kg	2.91	0.030±0.01	1.01±0.46
UVB_EGCG_50 mg/kg	3.45	0.059±0.01	1.70±0.14**

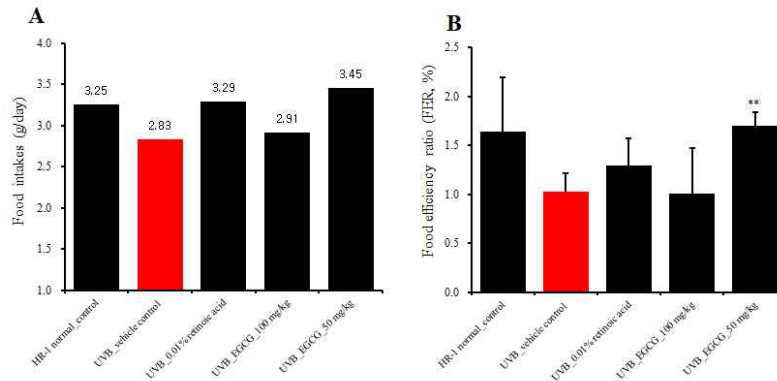


Fig. 35. Change of Food intakes and Food efficiency ratio. Values are expressed as means \pm SEM (n =3). Values are expressed as means \pm S.E. from two-independent experiments(** p<0.01).

라. EGCG의 UVB조사를 통한 피부보습에 미치는 영향

(1) Measurement of transepidermal water loss (TEWL): 표피 수분 손실량 측정

EGCG에 대한 피부보습 증진 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 8주 후 표피 수분 손실량 측정 한 결과, UVB-대조군 (vehicle control)의 표피 수분 손실량은 정상대조군인 (HR-1 normal)군에 비해 유의성 있게 증가하였다. EGCG 투여군의 표피 수분 손실량은 UVB-대조군 (vehicle control)에 비해 유의성 있게 감소를 나타냈으며, EGCG 100, 50 mg/kg 투여군은 농도 의존적으로 표피 수분 손실량이 감소를 나타내었다 (Fig. 36).

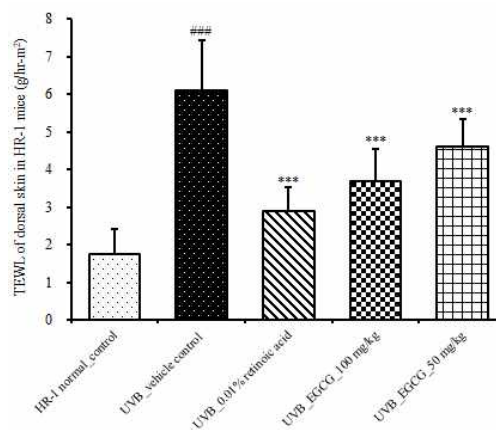


Fig. 36. Topical application of EGCG and retinoic acid increases stratum corneum hydration and decreases transepidermal water loss (TEWL) in control and UVB irradiated hairless mouse skin in vivo. TEWL was dramatically increased after UVB irradiation.

Topical application of EGCG decreased TEWL both in control and UVB irradiated hairless mice. Values are mean±SEM (n=3). Values are expressed as means ± S.E. from two-independent experiments(*** p<0.001). ### : p<0.001 compared with normal group.

(2) 세라마이드 대사 관련 효소 (Glucocerebrosidase)의 활성 측정

EGCG에 대한 피부보습 증진 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 8주 후 표피 β-glucosidase 활성을 측정한 결과, UVB-대조군 (vehicle control)의 피부 β-glucosidase 활성은 정상대조군인 (normal control)군에 비해 유의성 있게 감소하였다. EGCG 처리군의 표피 β-glucosidase 활성은 UVB-대조군 (vehicle control)에 비해 유의성 있게 증가를 나타냈으며, EGCG 100, 50 mg/kg 투여군은 농도 의존적으로 표피 β-glucosidase 활성이 증가되는 것으로 나타났다 (Fig. 37).

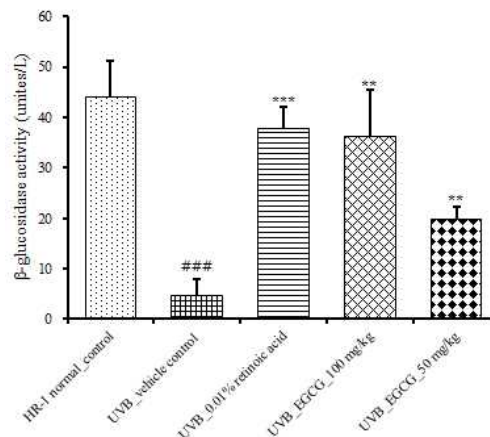


Fig. 37. Topical application of EGCG and retinoic acid increases stratum corneum hydration in control and UVB irradiated hairless mouse skin *in vivo*. Glucocerebrosidase was dramatically decreased after UVB irradiation. Topical application of EGCG increased β-glucosidase both in control and UVB irradiated hairless mice. Values are mean±SEM (n=3). Values are expressed as means ± S.E. from two-independent experiments(**p<0.01, *** p<0.001). ### : p<0.001 compared with normal group.

마. EGCG의 UVB조사를 통한 피부손상 유발 병태모델에서의 주름 관련

유전자 발현 분석

(1) 피부 염증유전자 발현 분석

EGCG에 대한 피부 주름개선 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 10주 후 등피부조직을 분리하여

염증관련 mRNA유전자 IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C), 그리고 NOS-II (D) 발현을 측정된 결과로 UVB_대조군 IL-1 β , IL-6, TNF- α , 그리고 NOS-II mRNA유전자 발현의 RQ값을 1로 했을 때 EGCG 투여군의 상대정량 값을 분석하였다. 그 결과 IL-1 β , IL-6, TNF- α , 그리고 NOS-II mRNA유전자 발현은 정상대조군 (Normal_control)에 비하여 UVB_대조군 (UVB_vehicle)이 IL-1 β , IL-6, TNF- α , 그리고 NOS-II mRNA유전자 발현이 증가되었다. 실험군에서는 EGCG 100 mg/kg 투여군이 대조군 (UVB_vehicle)에 비하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 그리고 NOS-II mRNA유전자 발현이 유의성 있게 감소하였다 (Fig.38A ~ D).

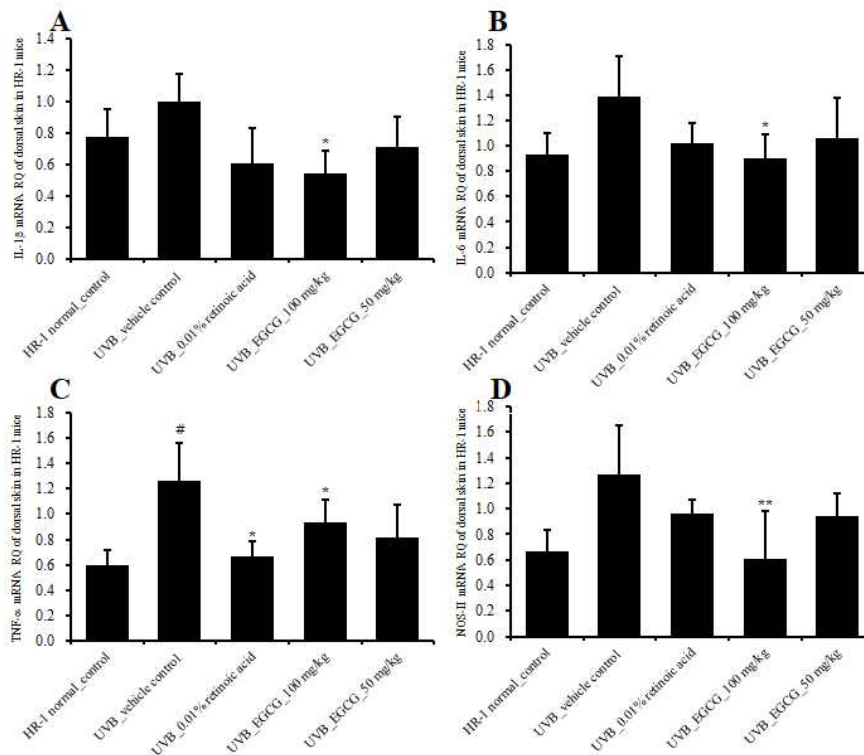


Fig. 38. Effects of EGCG and retinoic acid on proinflammatory cytokine expression in animal skins exposed to UVB. 10 weeks after the initiation of UVB irradiation (the stage of hyperpigmentation); The expression of IL-1 β , IL-6, TNF- α , and NOS-II mRNA levels in each sample was analyzed by real-time PCR and the relative quantities (RQ) of IL-1 β (A), IL-6 (B), TNF- α (C), and NOS-II (D) mRNA was normalized to the quantity of GAPDH. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred to as the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real-time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Values are expressed as means \pm S.E. from two-independent experiments(*p<0.05, ** p<0.01). # : p<0.05 compared with normal group.

(2) COX-2 염증유전자 발현 분석

EGCG에 대한 피부 주름개선 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 10주 후 등피부조직을 분리하여 COX-2 mRNA유전자 발현을 측정한 결과로 UVB_대조군 COX-2 mRNA유전자 발현의 RQ값을 1로 했을 때 EGCG 투여군의 상대정량 값을 분석하였다. 그 결과 COX-2 mRNA유전자 발현에서처럼 정상대조군 (Normal_control)에 비하여 UVB_대조군 (UVB_vehicle)이 COX-2 mRNA유전자 발현이 유의성 있게 증가되었다. 실험군에서는 EGCG 100 mg/kg 투여군이 대조군 (UVB_vehicle)에 비하여 유의성 있게 COX-2 mRNA유전자 발현이 감소하였다 (Fig. 39).

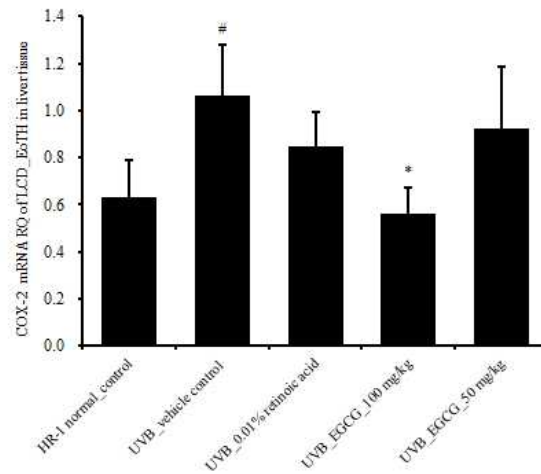


Fig. 39. Effects of EGCG and retinoic acid on COX-2 mRNA gene expression in animal skins exposed to UVB. 10 weeks after the initiation of UVB irradiation (the stage of hyperpigmentation); The expression of COX-2 mRNA levels in each sample was analyzed by real-time PCR and the relative quanyitatives (RQ) of COX-2 mRNA was normalized to the quantity of GAPDH. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Values are expressed as means \pm S.E. from two-independent experiments(* $p < 0.05$). # : $p < 0.05$ compared with normal group.

(3) MMP-2와 MMP-9 염증유전자 발현 분석

EGCG에 대한 피부 주름개선 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 10주 후 등피부조직을 분리하여 MMP-2와 MMP-9 mRNA유전자 발현을 측정한 결과로 UVB_대조군 MMP-2 mRNA유전자 발현의 RQ값을 1로 했을 때 EGCG 투여군의 상대정량 값을 분석하였다. 그 결과 MMP-2 mRNA유전자 발현은 정상대조군 (Normal_control)에 비하여 UVB_대조군 (UVB_vehicle)이 2.0배 이상 MMP-2 mRNA유전자 발현이 유의성 있게 증가되었다. 실험군에서는 EGCG 100 mg/kg 투여군이 대조군 (UVB_vehicle)에 비하여 유의성 있게 MMP-2 mRNA유전자 발현이 감소하였다(Fig. 40A). UVB_대조군 MMP-9 mRNA유전자 발현의 RQ값을 1로 했을 때 EGCG 투여군의 상대정량 값을 분석하였다. 그 결과 MMP-9 mRNA유전자 발현은 정상대조군 (Normal_control)에 비하여 UVB_대조군 (UVB_vehicle)이 MMP-9 mRNA유전자 발현이 유의성 있게 증가되었다. 실험군에서는 EGCG 100, 50 mg/kg 투여군이 대조군 (UVB_vehicle)에 비하여 MMP-9 mRNA유전자 발현이 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 40B).

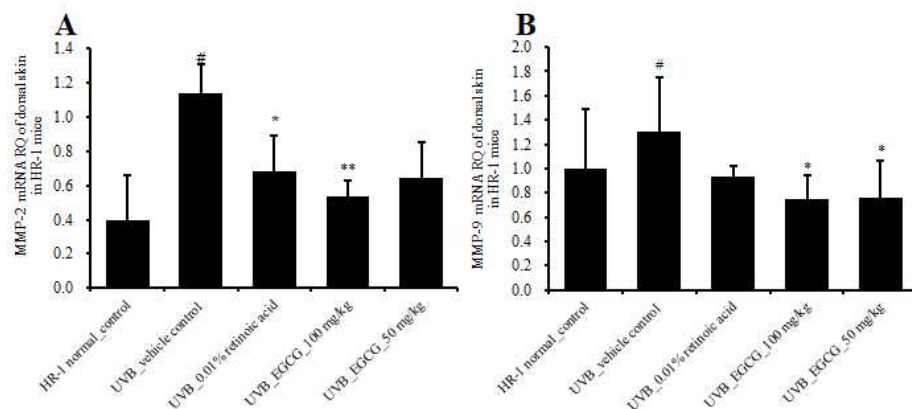


Fig. 40. Effects of EGCG and retinoic acid on MMP-2, MMP-9 mRNA gene expression in animal skins exposed to UVB. 10 weeks after the initiation of UVB irradiation (the stage of hyperpigmentation); The expression of MMP-2, MMP-9 mRNA levels in each sample was analyzed by real-time PCR and the relative quantities (RQ) of MMP-2, MMP-9 mRNA was normalized to the quantity of GAPDH. The amount of SYBR Green was measured at the end of each cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rises above the baseline is referred as to the RQ (relative quantitative) and is proportional to the target concentration. Real-time PCR was performed in duplicate and analyzed by a Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Values are expressed as means \pm S.E. from two-independent experiments(* p <0.05, ** p <0.01). # : p <0.05 compared

with normal group.

바. MMP-2 단백질 발현 분석

EGCG에 대한 피부 주름개선 효과를 측정하기 위해 HR-1 생쥐에 UVB를 조사하여 주름을 유도한 다음 10주 후 등피부조직을 분리하여 UVB광노화에 의한 피부 콜라겐 분해로 형성되는 주름생성 변화를 관찰하기 위하여 MMP-2 단백질 발현을 측정한 결과, UVB_대조군 MMP-2 단백질 발현을 등피부조직에서 EGCG 투여군의 생산량 차이를 분석하였다. 그 결과 MMP-2 단백질량은 (Normal_control)에 비하여 UVB_대조군 (UVB_vehicle)이 모두 20 배 이상 MMP-2 단백질 발현이 유의성 있게 증가되었다. 실험군에서는 EGCG 100, 50 mg/kg 투여로 대조군 (UVB_vehicle)에 비하여 유의성 있게 MMP-2 단백질 발현이 감소하였다 (Fig. 41).

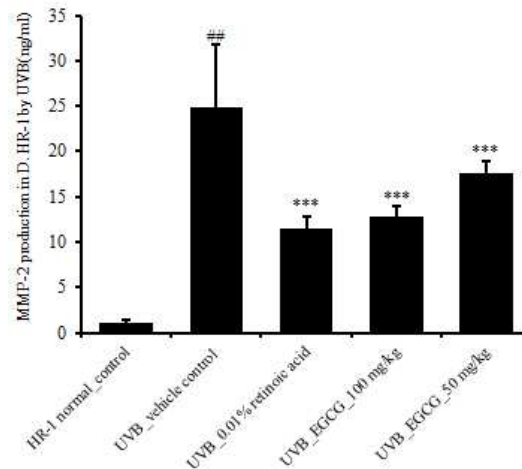


Fig. 41. Effects of EGCG and retinoic acid on MMP-2 protein expression in animal skins exposed to UVB. 10 weeks after the initiation of UVB irradiation (the stage of hyperpigmentation); The expression of MMP-2 protein production in each sample was analyzed by ELISA. The amount of MMP-2 ELISA kit was measured at the end of each cycle. Values are expressed as means \pm S.E. from two-independent experiments(*** p<0.001). ## : p<0.01 compared with normal group.

3. EGCG의 아토피 보습 NC/Nga Tnd Mice모델에서 병변의 호전유무 및 피부보습증진에 관한 효능 평가

가. 체중변화

실험동물의 체중 변화를 측정된 결과, NC/Nga 생쥐에 DNCB를 도포하여 아토피 피부염 모델을 유도한 후, 매일 3주간 일정한 시각에 3주간 양성대조군은 (Dex), EGCG (100, 50, 25 mg/kg)경구 투여하고, 체중의 증감 확인을 위해 몸무게를 측정하였다. 그 결과 모든 군에서 체중 감소는 확인되지 않았다 (Fig. 1).

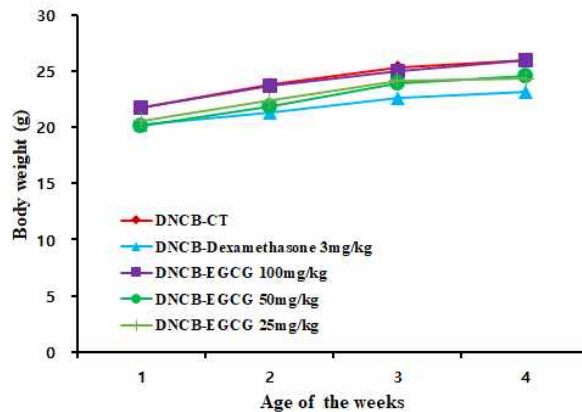


Fig. 1. Changes in body weight in experimental mice. Atopic dermatitis NC/Nga mice were induced by DNCB treatment in the dorsal skin, DNCB treatment for 3 weeks (CT), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 3mg/kg dexamethasone (Dex), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 100, 50, 25 mg/kg EGCG (EGCG-100, EGCG-50, EGCG-25).

나. Blood hematology

혈액 중 WBC의 수를 측정된 결과, 대조군에 비해 모든 실험군에서 감소하였지만 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 2).

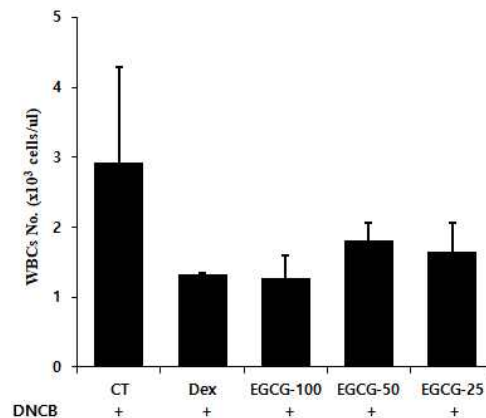


Fig. 2. Hematology in NC/Nga mouse. Atopic dermatitis NC/Nga mice were induced by DNCB treatment in the dorsal skin, DNCB treatment for 3 weeks (CT), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 3mg/kg dexamethasone (Dex), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 100, 50, 25 mg/kg EGCG (EGCG-100, EGCG-50, EGCG-25). After NC/Nga mice were anesthetized with ether, immediately blood was gathered from the heart by syringes contained heparin. Cell contents were analyzed by hematology (BD, USA). Statistically significant value compared with CT group data by student's T-test.

다. 비장세포 cytokine 발현

비장세포를 분리하여 배양 상층액에서의 cytokine 발현을 측정한 결과, IL 생산량은 EGCG (100, 50 mg/kg)투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 3A). IL-5 생산량은 EGCG (100, 50 mg/kg)투여군에서 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 3B). IL-13 생산량은 EGCG (100, 50 mg/kg)투여군에서는 대조군에 비해 감소하였지만 유의성은 나타나지 않았고, EGCG (25 mg/kg) 투여군에서는 대조군과 비슷한 수준으로 나타났다(Fig. 3C). IFN- γ 생산량은 EGCG (100 mg/kg)투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 3D).

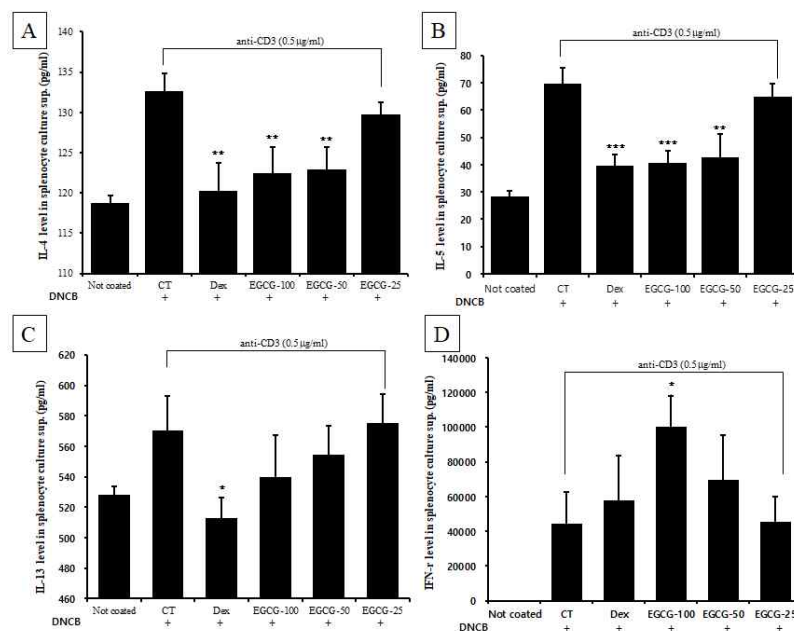


Fig. 3. Culture supernatant IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- γ level in splenocytes in NC/Nga mouse by DNCB. Atopic dermatitis NC/Nga mice were induced by DNCB treatment in the dorsal skin, DNCB treatment for 3 weeks (CT), DNCB treatment for 3 weeks with orally

administration of 3mg/kg dexamethasone (Dex), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 100, 50, 25 mg/kg EGCG (EGCG-100, EGCG-50, EGCG-25). Splenocytes from mice at 15 weeks of age were re-stimulated with CD3 mAb (1 μ g/ml) for 48 hrs. IL-4, IL-5, IL-13 and IFN- γ levels were measured by a sandwich ELISA using an mouse ELISA kit I (Biosource, USA). Statistically significant value compared with CT group data by student's T-test (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

라. ALN, PBMCs, spleen 그리고 등 피부조직에서 형광 유세포 분석

(1) 총 세포수 측정

실험 종료 후 15주령의 NC/Nga 생쥐를 ethyl ether로 마취한 후 ALN, spleen 그리고 등 피부 부위를 적출하여 총 세포수를 측정하였다. 등 피부 조직의 세포수는 대조군에 비해 EGCG (25 mg/kg)투여군에서 약간의 감소가 나타났고, EGCG (100, 50 mg/kg)투여군에서는 대조군과 비슷한 수준으로 나타났다(Fig. 4A). 비장에서의 세포수는 EGCG (100, 50, 25 mg/kg)투여군에서 대조군에 비해 감소하였지만 EGCG (100 mg/kg)투여군에서만 유의성이 나타났다(Fig. 4B). ALN 세포수는 EGCG (100 mg/kg)투여군에서만 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 4C).

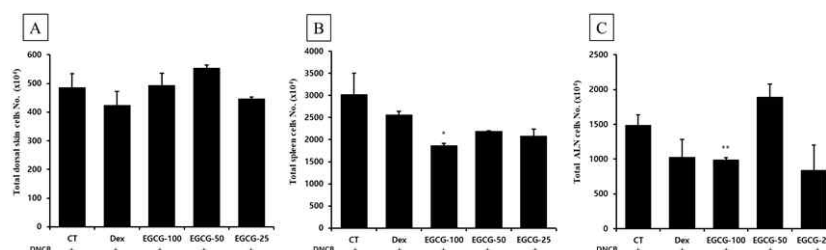


Fig. 4. Total cell number of ALN, spleen and dorsal skin in atopic dermatitis NC/Nga mice induced by DNCB. Atopic dermatitis NC/Nga mice were induced by DNCB treatment in the dorsal skin, DNCB treatment for 3 weeks (CT), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 3mg/kg dexamethasone (Dex), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 100, 50, 25 mg/kg EGCG (EGCG-100, EGCG-50, EGCG-25). Total cell count was (A) in NC/Nga mice dorsal skin, (B) in NC/Nga mice spleen and (C) in NC/Nga mice ALN. Statistically significant value compared with CT group data by student's T-test (*p<0.05, **p<0.01).

(2) 면역형광염색에 의한 cell contents 변화

(가) PBMCs에서 세포수 변화

CD4+ Th, CD8+ c/s T 세포수는 EGCG (100, 50, 25 mg/kg) 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가 하는 것으로 나타났다(Fig. 5A).

B220+CD23+인 세포수는 EGCG (100, 50, 25 mg/kg) 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 5B). CD3-CCR3+인 세포수는 EGCG (100, 50, 25 mg/kg) 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 5C).

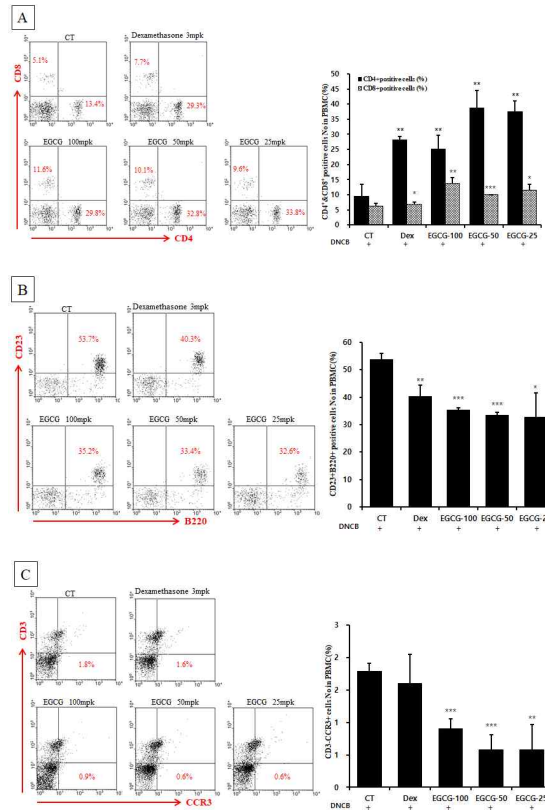


Fig. 5. Effects of EGCG on FACS analysis in PBMCs in atopic dermatitis NC/Nga mice induced by DNCB. Atopic dermatitis NC/Nga mice were induced by DNCB treatment in the dorsal skin, DNCB treatment for 3 weeks (CT), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 3mg/kg dexamethasone (Dex), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 100, 50, 25 mg/kg EGCG (EGCG-100, EGCG-50, EGCG-25). NC/Nga mouse PBMC cells (5×10^5 cells/ml) were isolated from blood and the PBMCs were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total cell content of $CD4^+CD8^+$, $B220^+CD23^+$ and $CD3^-CCR3^+$ in NC/Nga mouse PBMCs. Statistically significant value compared with CT group data by student's T-test (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

(나) ALN에서 총 절대 세포수 변화

CD8+ c/s T 총 절대 세포수는 EGCG (100 mg/kg) 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 6A). B220+/CD23+ 총 절대세포수는 EGCG (100, 25 mg/kg) 투여군에서 대

조균에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 6B).

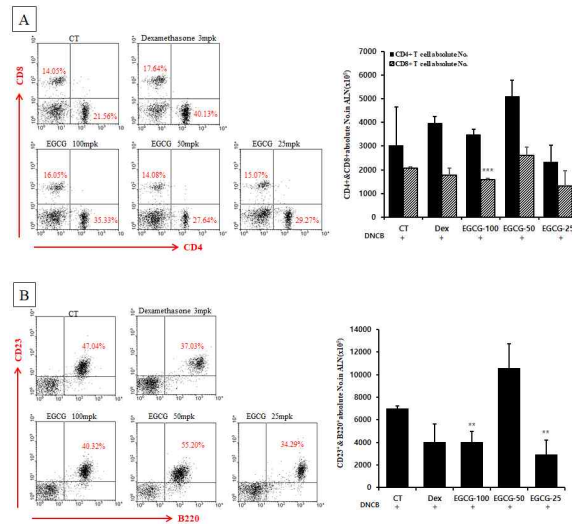
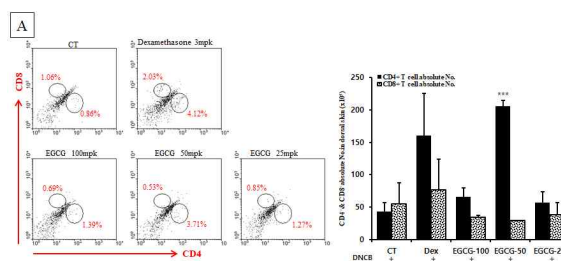


Fig. 6. Effects of EGCG on FACS analysis in ALN in atopic dermatitis NC/Nga mice induced by DNCB. Atopic dermatitis NC/Nga mice were induced by DNCB treatment in the dorsal skin, DNCB treatment for 3 weeks (CT), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 3mg/kg dexamethasone (Dex), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 100, 50, 25 mg/kg EGCG (EGCG-100, EGCG-50, EGCG-25). NC/Nga mouse ALN cells (5×10^5 cells/ml) were isolated from ALN, and the ALN cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total absolute number of CD4⁺&CD8⁺ and B220⁺CD23⁺ in NC/Nga mouse. Statistically significant value compared with CT group data by student's T-test (**p<0.01, ***p<0.001).

(다) 등 피부조직에서 총 절대 세포수 변화

CD4⁺ Th 총 절대 세포수는 EGCG (50 mg/kg) 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 증가 하는 것으로 나타났고, CD8⁺ c/s T 세포수는 EGCG (100, 50, 25 mg/kg)투여군에서는 대조군에 비해 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 7A). CD11b+Gr-1⁺ 총 절대 세포수는 EGCG (100 mg/kg) 투여군에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 7B).



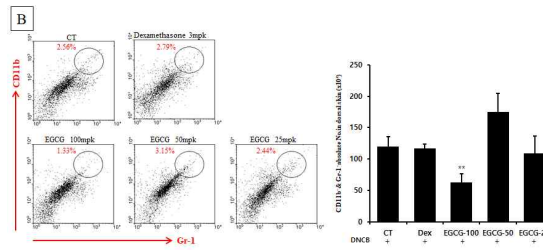


Fig. 7. Effects of EGCG on FACS analysis in dorsal skin tissue in atopic dermatitis NC/Nga mice induced by DNCB. Atopic dermatitis NC/Nga mice were induced by DNCB treatment in the dorsal skin, DNCB treatment for 3 weeks (CT), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 3mg/kg dexamethasone (Dex), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 100, 50, 25 mg/kg EGCG (EGCG-100, EGCG-50, EGCG-25). NC/Nga mouse dorsal skin cells (5×10^5 cells/ml) were isolated from dorsal skin, and the dorsal skin cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total absolute number of $CD4^+CD8^+$ and $CD11b^+Gr-1^+$ in NC/Nga mouse. Statistically significant value compared with CT group data by student's T-test (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$).

(라) Spleen에서 cell contents 변화

$CD8^+$ c/s T 총 절대 세포수는 EGCG (100, 50 mg/kg)투여군에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다(Fig. 8A). $B220^+CD23^+$ 총 절대세포수는 EGCG (100, 25 mg/kg) 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다 (Fig. 8B).

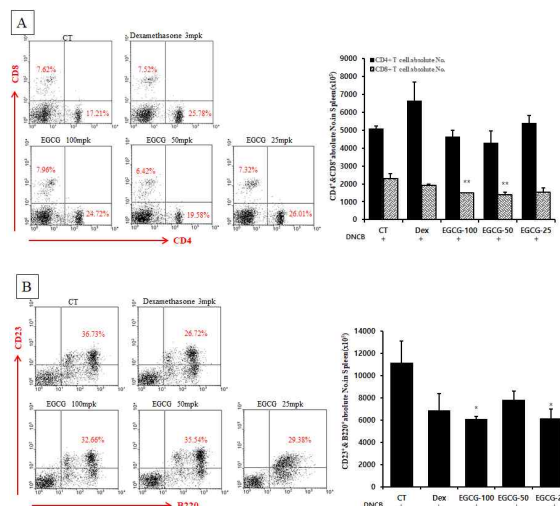
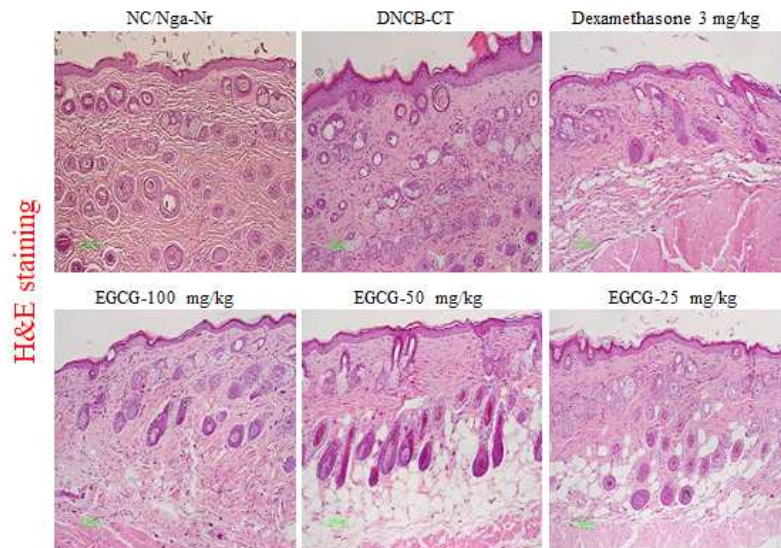


Fig. 8. Effects of EGCG on FACS analysis in spleen in atopic dermatitis NC/Nga mice induced by DNCB. Atopic dermatitis NC/Nga mice were induced by DNCB treatment in the dorsal skin, DNCB treatment for 3 weeks (CT), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of

3mg/kg dexamethasone (Dex), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 100, 50, 25 mg/kg EGCG (EGCG-100, EGCG-50, EGCG-25). NC/Nga mouse spleen cells (5×10^5 cells/ml) were isolated from spleen, and the spleen cells were washed twice and analyzed by flow cytometry. Total absolute number of CD4⁺&CD8⁺ and B220⁺CD23⁺ in NC/Nga mouse. Statistically significant value compared with DNCB_CT group data by student's T-test (*p<0.05, **p<0.01).

마. 등 피부 조직검사 및 분석

H&E 염색 결과 정상군에 비해 대조군에서는 epidermis의 두께가 두꺼워진 것을 확인 할 수 있는 반면, EGCG 투여군에서 대조군에 비해 epidermis의 두께가 줄어든 것을 확인할 수 있었고, toluidine 염색 결과 EGCG (100 mg/kg)투여군에서 비만세포의 침윤정도가 감소되었으나, EGCG (50, 25 mg/kg)투여군에서는 크게 감소되지 않은 것으로 확인되었다 (Fig. 9).



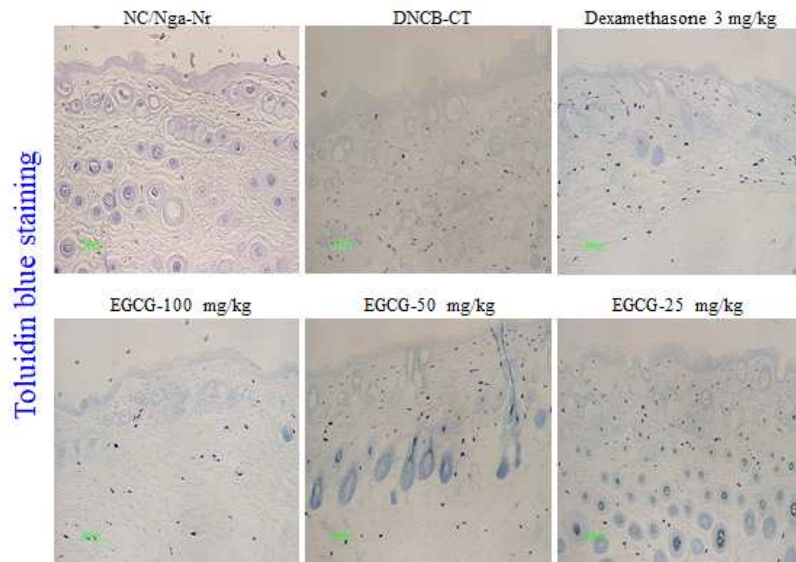


Fig. 9. Histological features of dorsal skin group in atopic dermatitis NC/Nga mice induced DNCB. Atopic dermatitis NC/Nga mice were induced by DNCB treatment in the dorsal skin, DNCB treatment for 3 weeks (CT), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 3mg/kg dexamethasone (Dex), DNCB treatment for 3 weeks with orally administration of 100, 50, 25 mg/kg EGCG (EGCG-100, EGCG-50, EGCG-25). NC/Nga mice skin biopsy were dyed with hematoxylin and eosin (H&E) and showed the change of the epidermis by bright microscope (x200). NC/Nga mice skin biopsy were dyed with toluidine blue and exposes the deranulated mast cells in the dermis by bright microscope (x200).

4. EGCG고함유 소재(EGTE)의 피부주름억제 전임상시험 결과

In vitro에서 사람 각질형성 (HaCat)세포에서 $TNF-\alpha$ / $IFN-\gamma$ 유도된 MMP-1의 발현을 억제하는 것을 확인하였고, In vivo에서 HR-1 생쥐에 UVB로 조사된 등 피부의 주름형성, 표피 두께, 콜라겐 침착 및 표피 수분 손실량의 감소를 확인하였으며, MMP-2와 MMP-9 mRNA의 효소 활성을 억제하는 것을 확인하였다.

제10절 피부주름억제 인체적용시험

CSR No.: LN_MOIS_01

임 상 시 험 결 과 보 고 서

녹차추출물의 피부 주름 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기
위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

12-weeks, double-blinded, randomized, placebo controlled study to
evaluate anti-wrinkle efficacy and safety of green tea extracts on
alleviating skin wrinkles in healthy volunteers

Protocol No.	LN_MOIS_01
Version	1.0 (작성일자: 2019. 03. 25)
Phase of Study	인체적용임상시험
Site initiation date	2018. 02. 20
Study completion date	2018. 11. 26
임상시험실시기관	충남대학교병원 피부과
시험책임자	이명 교수 MD, PhD
임상시험의뢰자	알앤오식품㈜

CONFIDENTIAL

본 임상시험 결과보고서와 관련된 모든 정보는 기밀사항이며 ㈜알앤오식품의 독점 소유
자산이므로 ㈜알앤오식품의 사전 동의 없이 유출할 수 없습니다.

임상시험책임자 서명 Principal Investigator Signature

녹차추출물의 피부 주름 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배
정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

12-weeks, double-blinded, randomized, placebo controlled study to evaluate anti-
wrinkle efficacy and safety of green tea extracts on alleviating skin wrinkles in
healthy volunteers

Authors:

본 결과보고서는 임상시험의 진행과정과 결과를 정확히 기술하였음을 확인합니다.

Principal Investigator:

서명  2019.04.03.

이명 교수 MD, PhD., 시험책임자(Principal Investigator)

충남대학교병원 피부과

목 차

목 차	3
1. 윤리적 고려	10
2. 임상시험의 명칭 및 단계	10
3. 임상시험 관련 기관	10
4. 임상시험의 배경 및 목적	11
5. 임상시험 계획	13
6. 임상시험용식품 투여	16
7. 관찰 및 검사의 항목 및 시기	17
8. 안전성, 유효성 평가 및 통계분석 방법	18
9. 시험대상자 참여 상황	24
10. 유효성 평가	26
11. 안전성 평가	30
12. 최종 결론	34
13. 참고문헌	34

요약

제 목	녹차추출물의 피부 주름 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험												
목 적	피부 주름이 있는 여성을 대상으로 대조식품(Placebo) 대비 녹차추출물의 유효성 및 안전성을 평가하고, 적정 용량을 결정하고자 하였다.												
임상시험 책 임 자	충남대학교병원 피부과 교수 이 영 M.D, Ph. D.												
임상시험 의 료 자	㈜알앤오식품												
임상시험 실시기관	충남대학교병원												
임상검사실 검사기관	충남대학교병원												
모니터링 수행기관	㈜메디팁												
인체적용시 험용제품	▶ 시험식품 녹차추출물(380mg)(EGCG고함유녹차추출물), ㈜알앤오식품 ▶ 대조식품 위약(380mg)(겔정셀룰로오스), ㈜알앤오식품												
예측 효능·효과	피부 주름 개선												
시 험 설 계	<ul style="list-style-type: none"> • 단계: 인체적용임상시험 • 임상시험 디자인 개요: 위약대조, 이중맹검, 무작위배정 디자인 <p>시험대상자 수 : 80 명</p> <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th></th> <th>시험식품군</th> <th>대조군 (위약군)</th> <th>총 대상자 수</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>산출 대상자 수</td> <td>32</td> <td>32</td> <td>64</td> </tr> <tr> <td>모집 대상자 수 (중도탈락율 15% 예상)</td> <td>40</td> <td>40</td> <td>80</td> </tr> </tbody> </table>		시험식품군	대조군 (위약군)	총 대상자 수	산출 대상자 수	32	32	64	모집 대상자 수 (중도탈락율 15% 예상)	40	40	80
	시험식품군	대조군 (위약군)	총 대상자 수										
산출 대상자 수	32	32	64										
모집 대상자 수 (중도탈락율 15% 예상)	40	40	80										
시험 대상자 수	총 시험대상자 수: 80명												
선 정 기 준	<ol style="list-style-type: none"> 1. 스크리닝 당시 만 30세이상 ~ 만 65세 이하의 피부 주름이 있는 여성 2. 육안평가에서 눈가 주름 grade 3 이상인 자 												

	<ol style="list-style-type: none"> 3. 선천성 또는 만성질환이 없고, 신체검진 상 병적 증상 또는 소견이 없는 자. 4. 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자
<p>제 외 기 준</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 현재 아토피 피부염, 건선염 등의 피부 질환을 앓고 있거나, 치료중인 자 2. 인체적용시험용 식품 관련 식품에 민감하거나 알레르기가 있는 자 3. 인체적용시험 부위에 점, 여드름, 흉반 모세혈관확장 등의 피부 이상 소견이 있는 자 4. 인체적용시험 시작 1개월 이내 안면부에 시술(피부 박피술, 기타 피부관리 등)을 받거나 6개월 이내 안면부에 보톡스, 필러 등의 시술을 받은 자 5. 인체적용시험 시작 3개월 이내에 스테로이드가 함유된 피부 외형제를 안면부에 사용하거나 경구레티노이드제/스테로이드제를 복용한 자 6. 인체적용시험 시작 2주 이내 주름개선용 기능성 화장품(레티노이드제,레티놀,AHA) 또는 고보습 화장품을 사용한 자 7. 인체적용시험 시작 1개월 이내 비만치료제(흡수저해제 및 항우울제, 식욕억제제 등), 피임약 또는 호르몬제, 이노제를 복용한 자 8. 인체적용시험 시작 1개월 이내에 다른 임상시험에 참여했거나 본 인체적용시험 기간 동안에 다른 임상시험에 참여할 계획이 있는 자 9. 정신분열증, 우울증, 약물중독 등의 정신질환자 10. 임신 중이거나 수유 중 또는 3개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자 11. 흡연자 또는 금연 후 1년이 지나지 않은 자 12. 기타 위의 사항들 외의 시험책임자의 판단으로 시험수행이 곤란하다고 판단되는 자
<p>시 험 방 법</p>	<p>• 투여 방법 및 기간</p> <ul style="list-style-type: none"> - 12주간 투여: 아래 2가지 제품중에 무작위 배정되어 1일 1회 경구 섭취하였다. 1) 시험식품 2) 대조식품 - 투여방법: 연구대상자는 위의 두 군 중 하나에 무작위배정 되어 12 주 동안 1 일 1 회 경구 섭취하였다

<p>평 가 방 법</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 유효성 평가 <ol style="list-style-type: none"> 1 일차 유효성 평가변수(Primary Endpoint) <ol style="list-style-type: none"> 1) 모사판 제작 및 분석을 통한 기기 평가 2) 전문가에 의한 눈가주름 육안 평가 2 이차 유효성 평가변수(Primary Endpoint) <ol style="list-style-type: none"> 1). 피부 수분량, 경피 수분 손실량 평가 2) 피부 색 평가 3) 대상자의 주관적 설문 평가 • 안전성 평가 <ol style="list-style-type: none"> 1. 이상반응: 자각 또는 타각 증상 2. 활력징후: 혈압 (앉은 자세), 맥박수, 체온 3. 신체검진 (문진, 시진, 촉진) 4. 임상검사실검사: 혈액화학검사, 혈액화학검사, 소변검사
<p>통계분석</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 인구학적 정보 평가 <p>안전성 및 인구통계학적 평가 집단의 연령, 신장, 체중에 대하여 섭취군별로 기술통계학적 분석을 시행하고 섭취군간 차이를 확인하였다.</p> • 유효성 평가 <p>유효성 평가변수는 Baseline 시점에서 최종평가시점까지의 변화량에 관한 평균과 표준편차 및 95% 신뢰구간 등을 제시하였다. 인체적용시험용 시험제품 섭취군에 피부주름 개선 결과의 평균 변화량 비교를 위해 Paired t-test 혹은 Wilcoxon signed-rank test 를 사용하였다.</p> • 안전성 평가 <p>안전성 시험대상자 집단에서 발생한 이상반응의 건수, 대상자수에 대하여 섭취군별로 비모수적 방법을 적용하여 비교하였다. 이상반응의 발생건수, 발생한 시험대상자수, 중증도(severity), 중대성(seriousness), 시험약과의 인과관계를 투약별로 도표화하였다. 활력징후, 심전도검사, 임상검사실검사 등의 검사 결과를 총괄적으로 검토하여 시험책임자 또는 시험담당자에 의해 임상적으로 유의하다고 판단된 항목에 한하여 필요에 따라 통계분석을 실시하였다.</p>

결과

본 인체적용임상시험의 목적은 만 30세이상 ~ 만 65세 이하의 피부 주름이 있는 여성을 대상으로 대조식품(Placebo) 대비 녹차추출물의 유효성 및 안전성을 평가하였고, 적정 용량을 결정하고자 하였다.

본 인체적용임상시험은 2018년 02월 20일에서 2018년 11월 26일까지 충남대학교병원에서 실시하였다. 전체 85명이 본 임상시험에 서면 동의하여 선정검사를 받았으나, 이 중 5명이 탈락되었고, 80명의 시험대상자가 무작위배정을 받았다. 1명이 투약 전 탈락하였고, 79명이 투약을 하였고, 이중 3명이 중도 탈락하여 76명이 임상시험 일정을 모두 완료하였다. Safety 분석군은 무작위 배정되어 임상시험용의약품을 한 번이라도 적용 받은 79명의 시험대상자가 포함되었다.

유효성 평가 결과:

1. 모사판 제작 및 분석을 통한 기기 평가 (visiometer)

* Skin roughness (R1)의 변화: R1 값의 섭취 전 - 섭취 12 주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이 및 섭취군별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 변화 차이 모두 통계적 유의성은 없었다.

Table. The change of skin roughness (R1)

Classification	시험식품군 (n=36)			대조군 (n=40)			independent t-test (p value)	paired t test (p value)
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD		
Base	0.44	0.44	0.12	0.45	0.46	0.08	0.1272	0.1539
Week 12	0.47	0.45	0.13	0.43	0.41	0.13		0.4017

* Maximum roughness (R2)의 변화: R2 값의 섭취 전 - 섭취 12 주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이 및 섭취군별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 변화 차이 모두 통계적 유의성은 없었다.

Table. The change of maximum roughness (R2)

Classification	시험식품군 (n=36)			대조군 (n=40)			independent t-test (p value)	paired t test (p value)
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD		
Base	0.27	0.26	0.07	0.28	0.27	0.07	0.1720	0.2695
Week 12	0.29	0.28	0.08	0.26	0.26	0.08		0.4018

* Average roughness (R3)의 변화: R3 값의 섭취 전 - 섭취 12 주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이 및 섭취군별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 변화 차이 모두 통계적 유의성은 없었다.

Table. The change of average roughness (R3)

Classification	시험식품군 (n=36)			대조군 (n=40)			independent t-test (p value)	paired t test (p value)
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD		
Base	0.18	0.17	0.04	0.18	0.18	0.04	0.1573	0.4535
Week 12	0.19	0.18	0.04	0.17	0.17	0.05		0.2166

* Smoothness depth (R4)의 변화: R4 값의 섭취 전 - 섭취 12 주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이 및 섭취군별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 변화 차이 모두 통계적 유의성은 없었다.

Table. The change of smoothness depth (R4)

Classification	시험식품군 (n=36)			대조군 (n=40)			independent t-test (p value)	paired t test (p value)
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD		
Base	0.16	0.16	0.05	0.18	0.17	0.04	0.0643	0.0586
Week 12	0.18	0.17	0.06	0.17	0.16	0.05		0.3403

* Arithmetic average roughness (R5)의 변화: R5 값의 섭취 전 - 섭취 12 주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이 및 섭취군별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 변화 차이 모두 통계적 유의성은 없었다.

Table. Arithmetic average roughness (R5)

Classification	시험식품군 (n=36)			대조군 (n=40)			independent t-test (p value)	paired t test (p value)
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD		
Base	0.06	0.05	0.03	0.07	0.07	0.02	0.1405	0.0249
Week 12	0.07	0.07	0.03	0.07	0.06	0.03		0.8301

2. 전문가에 의한 눈가 주름 육안 평가 (8 point scale)

전문가에 의한 눈가 주름 육안 평가 시 섭취 전 - 섭취 12 주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이는 통계적 유의성은 없었으나, 각 섭취군별로 섭취전 대비 12 주 시점의 변화 차이는 시험식품군과 대조군에서 모두 통계적으로 유의한 호전을 나타내었다.

Classification	시험식품군 (n=36)			대조군 (n=40)			independent t-	paired t test (p)
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD		

							test (p value)	value)
Base	3.75	4.00	0.73	3.60	3.00	0.78	0.4563	0.0027
Week 12	3.28	3.00	1.23	2.98	2.50	1.42		<.0001

안전성 평가 결과:

본 임상시험의 안전성 평가는 무작위배정 받은 후 한번이라도 임상시험용의약품을 복용한 79명(safety 분석군)의 시험대상자를 대상으로 실시하였다. 본 임상시험에서 발생한 이상반응은 대조식품 섭취군 7명에서 9건이 발생하였다. 시험식품 섭취군 7명에서 7건이 발생하였다.

이상반응의 중증도는 경증 또는 중등증이었으며 후유증 없이 회복되었다. 16건의 이상반응 중 의약품과의 관련성이 있는 이상반응은 9건 발생하였다.

임상시험 기간 동안 임상시험용식품 섭취 후 실시한 검사실 검사 결과 대부분의 검사실 검사 수치는 정상범위 또는 임상적으로 유의하지 않은 수준의 수치를 나타내었다. 활력징후, 신체검진에서는 모두 정상 또는 임상적으로 의미 없는 결과였다.

결론

본 인체적용임상시험은 피부 주름이 있는 여성을 대상으로 12주간 카테킨 고탄유녹차추출물을 복용하였을 때 안전성 평가 결과 중대한 이상반응은 없었으며, 두 섭취군간 유의성있는 차이는 없었다. 따라서 녹차추출물에 섭취에 의한 안전성은 확보되었음을 확인하였다. 1차 유효성평가에서 모사판 (visiometer)을 이용한 주름 측정결과 통계학적으로 유의미한 호전은 보이지 않았으나, 전문가에 의한 눈가 주름 육안 평가는 시험군에서 섭취전 대비 12주 시점의 변화가 통계적으로 유의한 호전을 나타내었다. 2차 유효성평가인 대상자의 주름만족도의 경우 시험군에서 섭취 전 대비 12주 시점의 변화는 통계학적으로 유의한 만족도를 나타내었다. 그 외 평가한 대상자의 식품만족도, 피부수분량, 피부수분손실량, 피부색평가에서는 통계적 유의성은 없었다. 이상의 임상 시험결과로 카테킨 고탄유녹차추출물은 모사판을 이용한 주름측정결과상 통계적으로 유의미한 호전은 없었으나, 전문가에 의한 눈가주름 육안평가 및 대상자의 만족도에서 통계적으로 유의한 만족도를 나타내어 카테킨 고탄유녹차추출물이 주름개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 추 후 카테킨 함량을 높이고, 대상자수를 늘려 연구가 필요할 것으로 사료된다.

1. 윤리적 고려

1.1. 임상시험 계획서 심의

임상시험 계획서는 시험대상자의 안전을 충분히 고려하여 작성되었으며, 임상시험 실시기관인 충남대학교병원 임상시험심사위원회(IRB)가 임상시험 계획서를 심의하여 임상시험 수행을 결정하였다. (승인일자: 2018.01.09-승인통지서 부록으로 첨부)

1.2. 윤리적 수행

본 임상시험은 International Conference on Harmonization (ICH) Guidelines for Korean Good Clinical Practices 및 헬싱키 선언의 원칙을 준수하였으며, 시험대상자 권익과 안전을 고려하여 국내 의약품 임상시험 관리기준(KGCP)과 관련 규정에 따라 수행되었다.

1.3. 시험대상자 정보와 동의

시험대상자 서면 동의서는 KGCP 및 관련규정, 헬싱키 선언에 입각한 윤리적 원칙에 부합하여 임상시험심사위원회(IRB)의 승인을 얻어 사용하였다. 본 임상시험을 시행하기 위한 모든 검사 및 시험대상자 등록에 앞서 시험자는 모든 시험대상자에게 임상시험과 관련된 세부사항을 충분히 설명하였고, 시험대상자로부터 사전에 서면 동의를 받음으로써 이를 문서화하였다. 서면 동의서에는 시험대상자의 서명 및 날짜와 함께 동의 과정을 시행한 사람의 서명 및 날짜가 함께 기재되도록 하였다. 서명되고 날짜가 기재된 동의서 사본은 임상시험 참여 이전에 시험대상자에게 제공되었으며 승인된 동의서 건본은 본 결과보고서에 [Appendix 1.3 최종 시험대상자 동의서 및 설명문]을 첨부하였다.

2. 임상시험의 명칭 및 단계

2.1. 임상시험의 명칭

녹차추출물의 피부 주름 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인체적용시험

12-weeks, double-blinded, randomized, placebo controlled study to evaluate anti-wrinkle efficacy and safety of green tea extracts on alleviating skin wrinkles in healthy volunteers

2.2. 임상시험의 단계

인체적용임상시험

3. 임상시험 관련 기관

3.1. 임상시험실시기관의 명칭 및 주소

기 관 명: 충남대학교병원
주 소: 대전광역시 중구 문화로 282 (우 35015)

3.2. 임상시험의 책임자, 공동연구자, 관리약사의 소속 및 성명

임상시험 담당자 및 관리약사

3.3. 임상시험의뢰자의 명칭 및 주소

의 료 자 명: ㈜알앤오식품
주 소: (34015)대전 유성구 테크노1로 11-6

3.4. 모니터링 수행기관의 명칭 및 주소

회 사 명: ㈜메디팁
주 소: (06336) 서울시 강남구 개포로 621(개포동) SH공사 4층 401호

4. 임상시험의 배경 및 목적

4.1. 임상시험의 배경

- 고령화 사회 진입에 따른 건강에 대한 관심 고조, 식생활 변화에 따른 비만은 당뇨병 및 심혈관질환등 생활습관형 질환을 야기하는 주요 원인이 될 뿐만 아니라 젊은 세대의 운동, 영양 욕구에 따른 뷰티 산업의 성장 등 사회 환경 변화에 따라 이너뷰티 및 다이어트 산업이 고성장하고 있음
- 국내 건강기능식품 산업은 꾸준히 성장하고 있으나, 히트 상품의 종류는 매년 바뀌고 있음. 이는 소비자들이 건강기능식품 소비에 있어서 브랜드보다는 개별인정을 받은 기능성 신물질에 대한 선호가 높기 때문임
- 최근 피부주름개선에 도움을 주는 이너뷰티 제품(허니부쉬, 휴온스제약㈜)이 식약처 기능성 개별 인정을 받으면서 각광을 받고 있음.
- 일상생활에서 손쉽게 섭취할 수 있는 피부 주름 개선에 도움을 주는 핵심소재 개발과 더불어 제품화 및 산업화를 통한 대중적 접근성이 용이한 다양한 제품에 응용할 수 있는 소재 및 추출물 제품개발 기술이 우선적으로 이루어져야 할 필요성 있음.
- 건기식 소비자층 분석 통계에 의하면 피부주름 개선 이너뷰티 건기식 시장의 경우 30~60 대가 90% 시장을 차지함. 따라서 최대 관심사인, 피부주름 개선 효능을 추가한 기능성 강화 제품으로 타 제품과 차별화할 필요가 있음

CSR No.: LN_MOIS_01

- 본 건기식 소재는 한국화학연구소에서 개발한 특허기술로, 고순도 EGCG 를 대량생산하는 기술을 보유하고 있으며, 녹차 건엽으로 부터 4 개 공정(추출, 침전, 분획, 재결정)을 거쳐 고순도 EGCG 를 분리 정제하여 제조함.
- 열수 추출 및 침전, 분획 공정 도입으로 EGCG 고함유(~80%)하는 차카테킨 혼합물을 제조한 후(아래 특허 1), 물을 이용한 재결정 공정 도입으로 고순도 EGCG(98%)를 제조함 (아래 특허 2)

특허명	등록번호 (등록일)	소유자	발명자	보유 국가
EGCG를 고순도로 함유하는 차카테킨 혼합추출물의 제조방법	10-2014-0063008 (2014.5.26.)	㈜알앤오식품	류시용 최상운	한국
EGCG의 고순도 양산 방법	10-1659423 (2016.09.19)	㈜알앤오식품	류시용 최상운	한국

- 고순도: 네덜란드 DSM 사, 일본 Taiyo 사 등 해외 선진기업의 EGCG 고함유 소재의 경우 순도가 90~95% 정도에 이르지만, 본 기술은 EGCG 98% 이상의 고순도 원료를 제조할 수 있음. 또 해외 경쟁사는 소량의 카페인이 잔류하나, 본 기술은 caffeine-free 임
- 안전성: 해외 선진기업에서 생산된 소재들의 스펙에 잔류용매와 카페인 항목이 확인되는 것으로 보아 제조공정에서 유기용매를 사용했을 가능성이 있음. 본 기술은 유기용매를 배제하고 물을 이용하여 재결정함으로써 잔류용매 유해성을 최소화하였음.
- 국내외 관련 기술의 특허 비교

구분	DSM(네덜란드)	㈜ 아모레퍼시픽	알앤오식품
특허출원	2000년~2006년	2001년	2014년
특허등록	2008년~2014년	2004년	해당사항 없음

주요기술	·EGCG 혼합물 제조 기술 ·대공극성 극성 수지 지상 및 적당한 극성 용출이동상을 사용한 크로마토그래피법 ·고순도(90%~94%) EGCG 분리 공정 기술 ·막모듈을 이용한 EGCG 고순도화 공정 기술 등	·카페인-EGCG 결합 및 분리기술 및 합성흡착제 이용한 크로마토그래피법을 통해 녹차 추출로부터(90%~ 97%) 고순도 EGCG 분리 공정 기술	·수용액 급냉 공정 및 역상컬럼크로마토그래피법을 통한 80%이상 EGCG 추출 및 분리기술(특허 기술 1) ·추가 1회이상 수용액상 재결정화를 통한 90~98% 고순도 EGCG 분리 공정 기술 (기술 2)
대량생산화	“Teavigo”라는 브랜드명으로 시장 선도		
시장점유	건강식품 분야에서 세계적 점유도 높음	국내/중국에서 화장품 분야에서 점유도 높은 편	
비고	2014년 Taiyo社로 Teavigo 브랜드명 라이선스 넘김	고순도 EGCG 납품 재료 적용 화장품 출시	수용액 처리 공정 비중 높아 친환경적 장점이 있으며 국내생산품임

4.2. 임상시험의 목적

피부 주름이 있는 여성을 대상으로 대조식품(Placebo) 대비 녹차추출물의 유효성 및 안전성을 평가하고, 적정 용량을 결정하고자 하였다.

5. 임상시험 계획

5.1. 전반적인 임상시험 방법

본 임상시험은 대조식품 또는 시험식품을 12주간 투여한 후 두 투여군 간의 유효성과 안전성을 비교 평가하는데 그 목적이 있었다. 이를 위해 본 임상시험은 무작위배정, 이중맹검, 위약대조의 설계로 진행하였다.

시험대상자 수 : 80 명

	시험식품군	대조군 (위약군)	총 대상자 수
산출 대상자 수	32	32	64
모집 대상자 수 (중도탈락율 15% 예상)	40	40	80

1 스크리닝 (Visit 1)

- 1) 시험대상자 동의, Baseline Number(BN) 부여: 시험대상자가 서면 동의한 순서대로 Baseline number (SXX)를 부여
- 2) 인구 정보 및 문진: 자원자의 성별, 생년월일, 연령 등 인구 정보를 확인하고, 과거 병력, 최근 병력 및 약물 복용력(30 일 이내) 등을 문진한다. 또한 신장과 체중은 소수 첫째 자리까지 기록
- 3) 활력징후: 혈압(수축기, 이완기), 맥박수, 체온
- 4) 신체검진
- 5) 병용약물 및 이상반응 확인
- 6) 시험대상자 적합성 평가
- 7) 시험대상자번호(Allocation number, AN) 부여: 스크리닝 통과 시험대상자를 대상으로 순서군별 대상자수에 따라 AXX 를 부여
- 8) 주름의 중등도 평가

2 관찰기(Visit 2, visit 4)

- 1) 활력징후: 혈압(수축기, 이완기), 맥박수, 체온
- 2) 신체검진
- 3) 병용약물 및 이상반응 확인
- 4) 주름의 중등도 평가
- 5) Visiometer 측정
- 6) 피부 수분 측정
- 7) 경피수분 손실량
- 8) 피부색 측정
- 9) 관찰자 평가
- 10) 대상자 평가
- 11) 사진촬영: 양팔의 상완부를 동일한 조건으로 촬영

3 관찰기(Visit 3)

- 1) 활력징후: 혈압(수축기, 이완기), 맥박수, 체온
- 2) 신체검진
- 3) 병용약물 및 이상반응 확인

5.2. 시험대상자의 선정기준, 제외기준, 목표한 시험대상자의 수

임상시험 시험대상자 모집 공고를 통하여 모집된 자원자 중, 모든 선정기준에 합당하고 어떠한 제외기준에도 해당하지 대상으로 하되, 시험의 목적에 따라 건강상태 등을 고려하여 본 임상시험에 적합하다고 시험자가 확인한 자원자를 시험대상자로 80명을 선정하였다.

5.2.1. 선정기준

1. 스크리닝 당시 만 30세이상 ~ 만 65세 이하의 피부 주름이 있는 여성
2. 육안평가에서 눈가 주름 grade 3 이상인 자
3. 선전성 또는 만성질환이 없고, 신체검진 상 병적 증상 또는 소견이 없는 자
4. 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

5.2.2. 제외기준

1. 현재 아토피 피부염, 건선염 등의 피부 질환을 앓고 있거나, 치료중인 자
2. 인체적용시험용 식품 관련 식품에 민감하거나 알레르기가 있는 자
3. 인체적용시험 부위에 점, 여드름, 흉반 모세혈관확장 등의 피부 이상 소견이 있는 자
4. 인체적용시험 시작 1개월 이내 안면부에 시술(피부 박피술, 기타 피부관리 등)을 받거나 6개월 이내 안면부에 보톡스, 필러 등의 시술을 받은 자
5. 인체적용시험 시작 3개월 이내에 스테로이드가 함유된 피부 외형제를 안면부에 사용하거나 경구레티노이드제/ 스테로이드제를 복용한 자
6. 인체적용시험 시작 2주 이내 주름개선용 기능성 화장품(레티노이드제, 레티놀, AHA) 또는 고보습 화장품을 사용한 자
7. 인체적용시험 시작 1개월 이내 비만치료제(흡수저해제 및 항우울제, 식욕억제제 등), 피임약 또는 호르몬제, 이뇨제를 복용한 자
8. 인체적용시험 시작 1개월 이내에 다른 임상시험에 참여했거나 본 인체적용시험 기간 동안에 다른 임상시험에 참여할 계획이 있는 자
9. 정신분열증, 우울증, 약물중독 등의 정신질환자
10. 임신 중이거나 수유 중 또는 3개월 이내에 임신을 계획하고 있는 자
11. 흡연자 또는 금연 후 1년이 지나지 않은 자
12. 기타 위의 사항들 외의 시험책임자의 판단으로 시험수행이 곤란하다고 판단되는 자

5.3. 시험대상자의 수

시험대상자 수: 총 80명

6. 임상시험용식품 투여

6.1. 섭취 방법

본 임상시험은 위약대조, 이중맹검, 무작위배정으로 진행하였다.

시험대상자 수 : 80 명

	시험식품군	대조군 (위약군)	총 대상자 수
산출 대상자 수	32	32	64
모집 대상자 수 (중도탈락율 15% 예상)	40	40	80

6.2. 임상시험용식품

6.2.1. 시험식품

- 1) 제 품 명 : 녹차추출물(380mg)
- 2) 원 료 : EGCG고함유녹차추출물
- 3) 색 상 : 적색
- 4) 기 능 성 분 : EGCG
- 5) 제 형 : 190mg EGCG/capsule

6.2.2. 대조식품: 의약 식품

- 1) 제 품 명 : 위약(380mg)
- 2) 원 료 : 결정셀룰로로스
- 3) 색 상 : 적색
- 4) 기 능 성 분 : 플라세보
- 5) 제 형 : 캡슐

6.3. 병용요법 및 주의사항

시험기간 중에는 계획서에 명시된 임상시험용식품 이외의 섭취하지 않는 것을 원칙으로 하였다. 단, 이상반응의 처치 등 필요한 경우에는 시험책임자의 판단에 따라 투약하도록 하였다. 시험책임자의 판단 없이 임의로 투약한 약물이 본 임상시험의 안전성, 유효성 평가에 영향을 줄 수 있다고 예상되는 경우 이 시험대상자는 탈락하도록 하였다. 그러나, 본 임상시험에서 이에 해당하는 경우는 없었다. 투여한 모든 약물과 투여사유는 반드시 근거문서와 증례기록서에 기재하고 시험책임자 또는 시험담당자가 서명하였다.

7. 관찰 및 검사의 항목 및 시기

임상시험 진행 과정 중 시행된 관찰 및 검사 항목별 일정을 다음과 같이 정리하였다.

구 분	스크리닝	Baseline	Week 6	Week 12
임상시험 날짜(Study day)	-14 ~ 1	1	42±7	84±7
방문 (Visit)	1	2	3	4
서면 동의 및 Baseline 번호(BN) 부여 ¹	●			
인구정보, 병력 조사	●			
활력징후 ²	●	●	●	●
신체검진 ³	●	●	●	●
임상검사실 검사	●			●
선정/제외기준 판정		●		
대상자번호(AN) 부여 ⁴		●		
외래방문	●	●	●	●
주름의 중등도 육안 평가 ⁵	●	●		●
Visiometer (모사판 제작 및 이미지 분석) 평가 ⁶		●		●
피부 수분 측정		●		●
경피 수분 손실량 측정		●		●
피부 색 측정		●		●
관찰자 평가 ⁷		●		●
대상자 평가 ⁸		●		●
사진촬영 ⁹		●		●
연구자 평가		●		●
인체적용시험용 제품 복용 ¹⁰		●	●	●
병용약물 확인 ¹¹	●	●	●	●
이상반응 확인 ¹²	●	●	●	●

1. 동의 순서대로 BN 을 부여하였다.
2. 모든 방문에 활력징후(수축기혈압, 이완기혈압, 맥박수)를 측정하였다.
3. 모든 방문에 신체검진을 시행하였다.
4. 선정/제외기준 판정에 따라 순서대로 대상자번호(AN)을 부여하였다.
5. 방문 1 스크리닝(투약 전),
6. 7. 8. 방문 2, 방문 4 의 외래방문시 측정하였다.
9. 모든 방문에 동일한 조건으로 진행하였다.
10. 인체적용시험기간동안 매일 섭취하였다.
11. 병용약물은 인체적용시험 전 기간 동안 수시로 확인하였다.
12. 이상반응은 인체적용시험 전 기간 동안 수시로 확인하였다.

· 안전성, 약동학 평가 및 통계분석 방법

8.1. 안전성 평가

8.1.1. 자타각 증상 등 이상반응

시험담당자는 임상시험 중 발생하는 모든 이상반응을 기록하였다. 이상반응은 가급적 의학진단 용어로 기록하였으며, 이것이 불가능할 경우 시험책임자 또는 시험담당자가 관찰하거나, 시험대상자가 보고한 증상 및 징후에 대한 용어를 기록하였다. 용어는 MedDRA (medical dictionary for regulatory activities)에 등록된 PT (preferred term)로 기록하였다. 되도록 최신 버전의 데이터베이스를 이용하되 임상시험 기간 동안 동일한 버전을 적용하였다.

CRF 예는 이상반응의 증상 및 징후, 지속시간 (시작/종료 날짜), 중증도 (경증, 중등증, 중증), 임상시험용식품과의 인과관계, 이상반응과 관련하여 취해진 조치, 중대한 이상반응의 여부 (예/아니오), 이상반응의 결과, 이상반응의 경과 등에 관하여 기록하였다. 임상시험 참여 이전부터 존재한 증상, 징후가 있는 경우, 이상반응으로 기록하지 않았다. 단, 임상시험 참여 이후 해당 증상, 징후의 빈도, 중증도, 범위 등에 변화가 있는 경우에는 이상반응으로 기록하였다

1) 심각한 정도의 평가

이상반응의 중증도는 임상적 판단에 근거하여 시험책임자 또는 담당자가 판단하였다. 최대 강도(maximal intensity)를 기준으로 하였으며, 아래 분류 기준을 참고하였다.

Grade	설명	
1	Mild AE(경증)	특별한 처치가 필요 없음. 증상이 없는 실험실적 검사 또는 방사선 결과의 이상 등
2	Moderate AE (중등증)	간단한 처치, 국소 처치, 비침습적 처치 등
3	Severe AE(중증)	입원 또는 침습적 처치 필요, 수혈, 치료적 내시경 또는 수술 등

2) 임상시험용식품과의 인과관계 평가

식품 투여와 이상반응 발생의 연관 정도는 임상적 판단에 근거하여 시험책임자가 판단하였다. 이때, 다음의 기준을 판단의 지표로 사용할 수 있었는데 “관련성이 의심됨 (possibly related)” 이상인 경우 약물과 인과론적 관련이 있다고 판단하였다.

인과관계		판단근거
1	관련성이 명백함 (Definitely related)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 약물을 투여하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우 ➢ 이상반응이 다른 어떤 이유보다 이 약 투여에 의해 가장 개연성 있게 설명되는 경우 ➢ 투여 중단으로 이상반응이 사라지는 경우 ➢ 재투여 (가능한 경우에만 실시) 결과가 양성인 경우 ➢ 이상반응이 약물 또는 동일 계열의 약물에 대해 이미 알려져 있는 정보와 일관된 양상을 보이는 경우
2	관련성이 많음 (Probably related)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 약물을 투여하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우 ➢ 이상반응이 다른 어떤 이유보다 이 약 투여에 의해 더욱 개연성 있게 설명되는 경우 ➢ 투여 중단으로 이상반응이 사라지는 경우
3	관련성이 의심됨 (Possibly related)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 약물을 투여하였다는 증거가 있고, 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우 ➢ 이상반응이 다른 가능성 있는 원인들과 같은 수준으로 약물 투여에 기인한다고 판단되는 경우 ➢ 투여 중단(실시된 경우)으로 이상반응이 사라지는 경우
4	관련성이 적음 (Unlikely)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 약물을 투여하였다는 증거가 있는 경우 ➢ 이상반응보다 가능성이 있는 원인이 있는 경우 ➢ 투여 중단(실시된 경우) 결과 음성이거나 모호한 경우 ➢ 재투여 결과(실시된 경우)가 음성이거나 모호한 경우
5	관련성이 없음 (Not related)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 시험대상자가 약물을 투여 받지 않은 경우 ➢ 약물 투여와 이상반응 발현과의 시간적 순서가 타당하지 않는 경우 ➢ 이상반응에 대해 다른 명백한 원인이 있는 경우
6	불명(Unknown)	<ul style="list-style-type: none"> ➢ 연관성을 판단하기에 근거가 부족한 경우 ➢ 정보가 불충분하거나 상충되어 판단할 수 없고 이를 보완하거나 확인할 수 없는 경우

3) 이상반응 관련 조치

이상반응이 발생하여 시행한 조치를 다음의 표를 참고하여 기록하였다.

No.	설명
1	투여 중지 (Drug withdrawn)
2	치료약물 병용 투여 (Concomitant medication taken)

3	약물 외 치료 (Non-drug therapy given)
4	알 수 없음 (Unknown)
5	해당사항 없음 (Not Applicable)

4) 이상반응의 결과

No.	설명
1	회복됨/해결됨 (Recovered/Resolved)
2	회복중임/해결중임 (Recovering/Resolving)
3	회복되지 않음/해결되지 않음 (Not recovered/Not resolved)
4	회복되었으나 후유증이 남음/해결되었으나 후유증이 남음 (Recovered/Resolved with sequelae)
5	사망 (Fatal)
6	알 수 없음 (Unknown)

5) 이상반응의 경과

No.	설명
1	1 회: 이상반응 보고 전에 이미 소실한 경우
2	간헐적: 한 번의 시기 내에서 소실했다가 다시 발생하는 경우
3	지속됨: 이상반응 보고 시에도 소실하지 않은 경우

6) 중대한 이상반응의 보고

임상시험책임자는 임상시험 중 중대한 이상반응이 발생한 때는 즉시 임상시험심사위원회 및 임상시험의뢰자에게 보고하도록 하였다. 특히 중대하고 예상하지 못한 약물이상반응 (SUSAR)인 경우 별도의 지시가 있을 때까지 해당 임상시험용식품에 대한 임상시험의 일부 또는 전부를 중지하도록 하였다. 즉, 모든 중대한 이상반응을 중대한 이상반응 신속보고양식에 의거, 임상시험의뢰자(㈜알앤오식품)에게 인지한 후 24시간 이내, 혹은 늦어도 다음 근무일까지 전화(또는 팩시밀리)로 보고하도록 하였으며, 개별 임상시험심사위원회에 보고해야 하는 경우도 있으므로 이를 확인하도록 하였다. 또한, 중대하고 예상하지 못한 약물이상반응인 경우 발생 후 5일 이내에 문서로 상세한 내용이 포함된 추가 보고를 하도록 하였다.

7) 이상반응의 추적 관리

시험책임자 또는 담당자는 이상반응이 나타난 시험대상자에 대해 증상이 가라앉고 참고범위 밖의 임상검사실검사의 측정값이 참고범위 또는 기저값으로

회복되거나, 혹은 관찰된 변화에 대해 만족스러운 설명이 될 때까지 추적 관찰하였다.

8.1.2. 임상검사실검사, 활력징후, 12전극 심전도검사

본 임상시험은 안전성과 유효성을 평가하는데 목적이 있으며 이와 같은 임상시험의 경우 각 순서군에 배정되는 시험대상자 수가 적을 뿐만 아니라 시험대상자 개개인에 따라 기저값이 상이하기 때문에, 전체 시험대상자를 대상으로 한 엄밀한 통계분석은 시행하지 않고 시험대상자 별 측정값의 이상여부를 판단하여 이의 임상적 의미를 기재하고 임상시험용 의약품과의 관련성 여부를 검토하였다. 모든 시험대상자의 임상검사실검사 결과 및 활력징후는 도표화하여 총괄적으로 검토하였다.

8.1.3. 안전성 평가

이상반응 발생에 대해서 그 양상을 섭취군별로 비모수적 방법을 적용하여 비교하였다. 이상반응 발생에 대해서 발생건수, 발생한 시험대상자수, 중증도(severity), 중대성(seriousness), 임상시험용 의약품과의 인과관계를 섭취군별로 기술통계학적으로 분석하였다.

활력징후, 12 전극 심전도검사, 임상검사실검사 등의 검사 결과를 총괄적으로 검토하여 연구자에 의해 임상적으로 유의성을 개별적으로 판단하였다.

8.2. 유효성 평가

8.2.1. 일차 유효성 평가변수에 대한 분석

(1) 피부 주름개선 효능평가 (visiometer 평가)

: Silicone으로 제작한 리플리카를 미세주름 분석장비인 visiometer (Skin-Visiometer SV 700, Courage&Khazaka, Germany) 를 통해 주름의 중증도의 평가 및 치밀도, 진피 두께 변화를 측정한다. 리플리카 제작은 시험대상자가 누운 상태에서 검사부위를 노출시킨 다음 푸른색 액상 Silicone으로 모사판을 제작하고 장비를 통해 분석한다.

미세주름 분석장비

- 푸른색 액상 실리콘으로 피부의 모사판(Replica)을 제작하고 제작된 주름 모사판에 빛을 투과시켜 피부의 미세주름과 거칠기 등을 분석하는 장비이다.
- 본체에 Visioscan VC98(Camera)을 연결하여 사용이 가능하다.
- Measurement Depth : 0 ~ 0.4mm

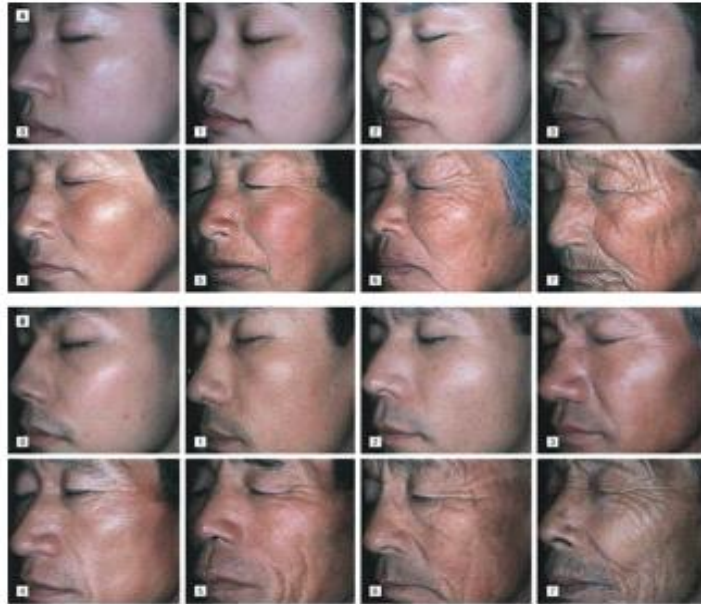


(2) 전문가에 의한 눈가 주름 육안 평가

: 피부과 전문의가 눈가 주름 정도를 Global photodamage score 에 근거하여 아래와 같은 점수로 평가한다. 두 전문가의 평가에 차이가 있을 경우, 주름 개선 정도는 낮은 단계를 선택한다.

Global Photodamage score

Rating	Description
0	None
1	none / mild
2	Mild
3	mild / moderate
4	Moderate
5	moderate / severe
6	Severe
7	very severe



(Ref : **Cutaneous Photodamage in Koreans Influence of Sex, Sun Exposure, Smoking, and Skin Color**, Arch Dermatol vol. 137(8) : 1043-1051, 2001)

8.2.2. 이차 유효성 평가변수에 대한 분석

(1) 피부 보습 효능평가

: 환기가 되지 않는 밀폐된 공간에서 시험대상자의 검사부위를 노출시킨 다음 20 분 동안 안정을 취하고 난 후 평가 변수들을 측정한다. 측정하는 방의 실내온도는 20~22°C, 상대 습도는 40~45%로 일정하게 유지한다. tewameter 을 이용하여 표피 수분 소실량을 측정하며, 피부 표면의 수분함량은 Corneometer 를 이용하여 수분 함량에 따른 정전 용량(capacitance)을 측정 함으로써 수분 함량의 상대적 크기를 측정한다. 피부의 홍반 정도는 Mexameter 장비를 이용하여 측정한다. 측정치는 임의 단위인 arbitrary unit (AU)로 표시하였으며 측정값은 3 회 측정 후 평균값을 이용하였다. 각각의 값은 실험 첫날 아무런 처치가 이루어지기 전인 오전에 측정하여 이를 기준치로 삼았다.

(2) 연구 대상자에 의한 주관적 설문평가

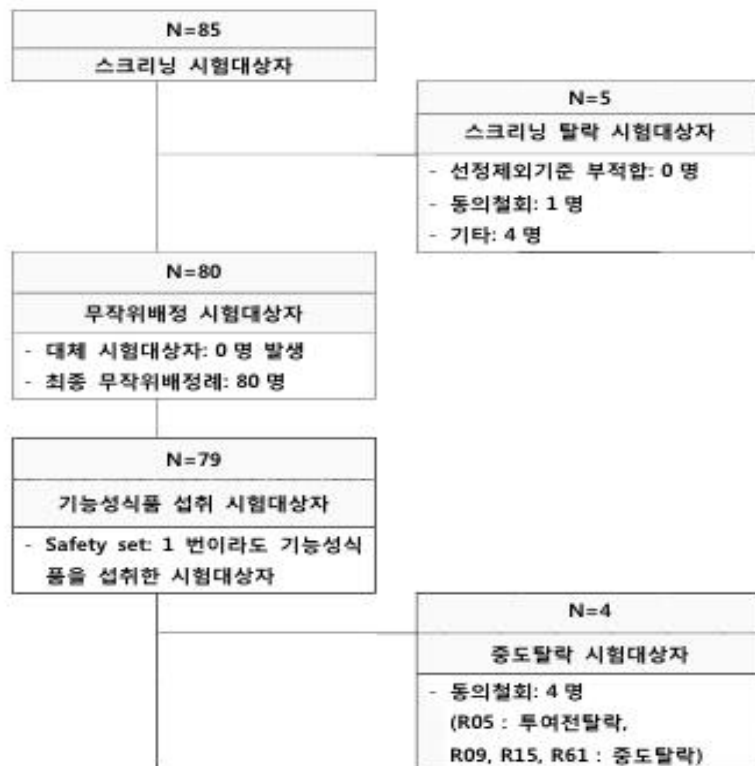
시료 적용 4 주 후, 적용 8 주 후, 적용 12 주 후에 연구 대상자를 대상으로 시료의 일반적 평가 (사용감), 효능성 평가, 이상반응 평가, 시료에 대한 호감도

등을 설문조사 하였다.

9. 시험대상자 참여 상황

본 임상시험은 2018년 02월 20일에서 2018년 11월 26일까지 충남대학교병원에서 실시되었다. 전체 85명이 본 임상시험에 서면 동의하여 선정검사를 받았으나, 이 중 5명이 탈락되었고, 80명의 시험대상자가 무작위배정을 받았다. 1명이 투약전 탈락하였고, 79명이 투약을 하였고, 이중 3명이 중도 탈락하여 76명이 임상시험 일정을 모두 완료하였다. Safety 분석군은 무작위 배정되어 임상시험용의약품을 한 번이라도 적용 받은 79명의 시험대상자가 포함되었다.

무작위 배정을 받은 80명은 모두 ITT분석군에 포함이 되었으며, 79명의 시험대상자가 safety분석군에 포함되었다. 임상시험계획서에 따라 본 임상시험을 완료한 시험대상자는 76명 였다.



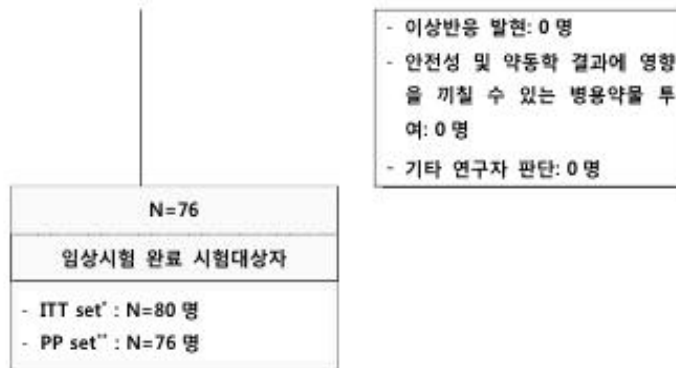


Figure 1. 시험대상자 등록 현황

9.1. 안전성, 유효성 분석 대상

임상시험용식품을 한 번이라도 복용한 시험대상자는 안전성 분석 대상으로, 모든 임상시험 일정을 마친 시험대상자는 유효성 분석 대상으로 하였다. 79명이 안전성 평가 대상에, 76명이 유효성 평가 대상에 포함되었다.

9.2. 인구 정보 및 임상시험 참여 전 상태

9.2.1. 인구 정보

임상시험용식품별 스크리닝 시 대상자 선정/제외 기준 평가시 활용된 연령, 체중, 신장에 대해 순서군별로 기술통계량을 제시하고, 순서군간 차이를 확인하였다.

Table 3. 시험대상자 기초 정보(ITT군 = 80명)

Variable	Statistic	Test (N=40)	Placebo (N=40)	All Subjects (N=80)	p-value
Sex					NA
Male	n(%)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Female	n(%)	40 (10.0)	40 (10.0)	80 (100.0)	
Age (years)	N	40	40	80	0.6110
	Mean	50.6	49.4	50.0	
	SD	9.7	10.0	9.8	
	Median	51.0	46.0	49.5	
	Min	31.0	32.0	31.0	
	Max	65.0	64.0	65.0	
Height (cm)	N	40	40	80	0.5614
	Mean	159.4	158.6	159.0	

Variable	Statistic	Test (N=40)	Placebo (N=40)	All Subjects (N=80)	p-value
	SD	5.7	5.7	5.7	
	Median	159.3	158.3	158.8	
	Min	143.9	143.2	143.2	
	Max	172.4	174.2	174.2	
Weight (kg)	N	40	40	80	0.5256
	Mean	59.4	58.3	58.9	
	SD	7.8	8.2	8.0	
	Median	59.4	58.3	59.1	
	Min	43.1	42.9	42.9	
	Max	77.4	78.0	78.0	

9.2.2. 병력 및 수술력

무작위배정 받은 80명의 시험대상자 중 임상적으로 유의한 수준의 과거 또는 현 병력, 수술력을 가진 시험대상자는 없었다.

9.2.3. 활력징후

무작위배정 받은 80명의 시험대상자를 대상으로 활력징후를 측정된 결과, 임상적으로 유의한 수치를 나타낸 경우는 없었다.

9.2.4. 임상검사실검사

임상검사실검사 결과는 모두 정상범위이거나 임상적으로 의미가 없는 비정상 범위에 해당하는 수치를 보였다.

9.2.5. 신체검진

무작위배정 받은 80명에서 신체검진 항목에 대해 조사한 결과, 모든 항목에서 정상 소견을 보였다.

10. 유효성 평가

10.1. 1차 유효성 평가

유효성 평가는 임상시험용식품을 모두 투여 받았고, 임상시험계획서에 따라 임상시험을 완료한 76명의 시험대상자를 대상으로 실시하였다.

1. 모사판 제작 및 분석을 통한 기기 평가 (visiometer)

* Skin roughness (R1)의 변화: R1 값의 섭취 전 - 섭취 12 주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이 및 섭취군별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 변화 차이 모두 통계적 유의성은 없었다.

Table. The change of skin roughness (R1)

Classification	시험식품군 (n=36)			대조군 (n=40)			independent t-test (p value)	paired t test (p value)
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD		
Base	0.44	0.44	0.12	0.45	0.46	0.08	0.1272	0.1539
Week 12	0.47	0.45	0.13	0.43	0.41	0.13		0.4017

* Maximum roughness (R2)의 변화: R2 값의 섭취 전 - 섭취 12 주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이 및 섭취군별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 변화 차이 모두 통계적 유의성은 없었다.

Table. The change of maximum roughness (R2)

Classification	시험식품군 (n=36)			대조군 (n=40)			independent t-test (p value)	paired t test (p value)
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD		
Base	0.27	0.26	0.07	0.28	0.27	0.07	0.1720	0.2695
Week 12	0.29	0.28	0.08	0.26	0.26	0.08		0.4018

* Average roughness (R3)의 변화: R3 값의 섭취 전 - 섭취 12 주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이 및 섭취군별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 변화 차이 모두 통계적 유의성은 없었다.

Table. The change of average roughness (R3)

Classification	시험식품군 (n=36)			대조군 (n=40)			independent t-test (p value)	paired t test (p value)
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD		
Base	0.18	0.17	0.04	0.18	0.18	0.04	0.1573	0.4535
Week 12	0.19	0.18	0.04	0.17	0.17	0.05		0.2166

* Smoothness depth (R4)의 변화: R4 값의 섭취 전 - 섭취 12 주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이 및 섭취군별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 변화 차이 모두 통계적 유의성은 없었다.

Table. The change of smoothness depth (R4)

Classification	시험식품군 (n=36)			대조군 (n=40)			independent t-test (p value)	paired t test (p value)
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD		
Base	0.16	0.16	0.05	0.18	0.17	0.04	0.0643	0.0586
Week 12	0.18	0.17	0.06	0.17	0.16	0.05		0.3403

* Arithmetic average roughness (R5)의 변화: R5 값의 섭취 전 - 섭취 12 주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이 및 섭취군별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 변화 차이 모두 통계적 유의성은 없었다.

Table. Arithmetic average roughness (R5)

Classification	시험식품군 (n=36)			대조군 (n=40)			independent t-test (p value)	paired t test (p value)
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD		
Base	0.06	0.05	0.03	0.07	0.07	0.02	0.1405	0.0249
Week 12	0.07	0.07	0.03	0.07	0.06	0.03		0.8301

-2. 전문가에 의한 눈가 주름 육안 평가 (8 point scale)

전문가에 의한 눈가 주름 육안 평가 시 섭취 전 - 섭취 12 주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이는 통계적 유의성은 없었으나, 각 섭취군별로 섭취전 대비 12 주 시점의 변화

차이는 시험식품군과 대조군에서 모두 통계적으로 유의한 호전을 나타내었다.

Classification	시험식품군 (n=36)			대조군 (n=40)			independent t-test (p value)	paired t test (p value)
	Mean	Median	SD	Mean	Median	SD		
Base	3.75	4.00	0.73	3.60	3.00	0.78	0.4563	0.0027
Week 12	3.28	3.00	1.23	2.98	2.50	1.42		<.0001

10.2. 2차 유효성 평가

1. 주름만족도

주름에 대한 대상자 만족도를 설문조사하였을 때, 섭취 전 - 섭취 12주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이는 통계적 유의성은 없었으나 각 섭취군별로 섭취 전 대비 12주 시점의 변화 차이는 시험식품군에서 통계학적으로 유의하게 더 높은 만족도를 나타내었다 (P <0.0001).

Parameter	Group	n	Week 0		Week 6		Week 12		Week0-Week6		Week0-Week12	
			mean	std	mean	std	mean	std	independent t-test (p value)	paired t test (p value)	independent t-test (p value)	paired t test (p value)
대상자 만족도	Test	36	1.39	0.73	1.83	0.66	2.14	0.76	0.4089	0.0032	0.0621	<.0001
	Placebo	40	1.40	0.74	2.03	0.83	1.70	0.82		0.0004		0.0898

2. 식품만족도

식품에 대한 대상자 만족도를 설문조사하였을 때, 섭취 전 - 섭취 12주 후 변화량에 대한 시험군과 대조군의 차이 및 섭취군별로 섭취 전 대비 12주 시점의 변화 차

이 모두 통계적인 유의한 차이는 없었다.

Parameter	Group	n	Week 6		Week 12		independent t-test (p value)	paired t test (p value)
			mean	std	mean	std		
시험 식품 만족도	Test	36	2.36	0.99	2.44	0.77	0.0841	0.5710
	Placebo	40	2.43	0.81	2.15	0.86		0.0621

- 2차 유효성 평가: 식품섭취 전, 섭취 후 피부수분량, 피부수분 손실량, 피부색 평가 (melanin, erythema)를 하였을 때 시험식품군과 대조군간의 통계적인 유의한 차이는 없었다.

10.3. 유효성 평가 결론

카테킨 고함유 녹차추출물을 12주간 복용하였을 때 1차 유효성평가에서 모사판 (visiometer)을 이용한 주름 측정결과 통계학적으로 유의미한 호전은 보이지 않았으나, 전문가에 의한 눈가 주름 육안 평가는 시험군에서 섭취전 대비 12주 시점의 변화가 통계적으로 유의한 호전을 나타내었다. 2차 유효성평가인 대상자의 주름만족도의 경우 시험군에서 섭취전 대비 12주 시점의 변화는 통계학적으로 유의한 만족도를 나타내었다. 그 외 평가한 대상자의 식품만족도, 피부수분량, 피부수분손실량, 피부색평가에서는 통계적 유의성은 없었다.

11. 안전성 평가

11.1. 분석에 포함된 대상군 (Data Sets Analyzed)

안전성 평가는 임상시험용식품을 한번이라도 투여 받은 79명(safety 분석군)의 시험대상자를 대상으로 실시하였다.

11.2. 폭로의 정도

본 임상시험은 무작위 배정을 받은 79명이 임상시험용식품을 투여 받았고, 76명 모두 임상시험을 완료하였다.

11.3. 이상반응

11.3.1. 이상반응에 대한 요약

본 임상시험의 안전성 평가는 무작위배정 받은 후 한번이라도 임상시험용의약품을 복

용한 79명(safety 분석군)의 시험대상자를 대상으로 실시하였다. 본 임상시험에서 발생한 이상반응은 대조식품 섭취군 7명에서 9건이 발생하였다. 시험식품 섭취군 7명에서 7건이 발생하였다.

Table 6. 섭취군별 이상반응

Category	Test (N=39)			Placebo (N=40)			All subjects (N=79)		
	n	%	#	n	%	#	n	%	#
Adverse Events	7	17.9	7	7	17.5	9	14	17.7	16
Adverse Drug Reaction	7	17.9	7	7	17.5	9	14	17.7	16
Seriousness	7	17.9	7	7	17.5	9	14	17.7	16
Non-serious	7	17.9	7	7	17.5	9	14	17.7	16
Serious	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Severity	7	17.9	7	7	17.5	9	14	17.7	16
Mild	6	15.4	6	6	15.0	8	12	15.2	7
Moderate	1	2.6	1	1	2.5	1	2	2.5	9
Severe	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Relationship	7	17.9	7	7	17.5	9	14	17.7	16
Definitely related	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Probable related	1	2.6	1	1	2.5	1	2	2.5	2
Possibly related	2	5.1	2	5	12.5	5	7	8.9	7
Unlikely	4	10.3	4	3	7.5	3	7	8.9	7
Not related	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Unknown	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Outcome	7	17.9	7	7	17.5	9	14	17.7	16
Recovered/Resolved	7	17.9	7	7	17.5	9	14	17.7	16
Recovering/Resolving	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Not recovered/Not resolved	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Recovered/Resolved with sequelae	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Fatal	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Unknown	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Action taken	7	17.9	7	7	17.5	9	14	17.7	16
Drug withdrawn	2	5.1	2	4	2.5	1	3	3.8	3
Dose reduced	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Dose increased	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Dose not change	3	7.7	3	4	10.0	4	7	8.9	7

Category	Test (N=39)			Placebo (N=40)			All subjects (N=79)		
	n	%	#	n	%	#	n	%	#
Concomitant medication taken	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Non-drug therapy given	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Unknown	0	00.0	0	0	00.0	0	0	00.0	0
Not Applicable	2	5.1	2	3	7.5	4	5	6.3	6
Pattern of Adverse Event	7	17.9	7	7	17.5	9	14	17.7	16
Single event	1	2.6	1	4	10.0	5	5	6.3	6
Intermittent	4	10.3	4	3	7.5	3	7	8.9	7
Continuous	2	5.1	2	1	2.5	1	3	3.8	3

n=number of subjects with AEs,

%=percentage of subjects among N,

#=number of AEs

이상반응의 중증도는 경증 또는 중등증이었으며 후유증 없이 회복되었다. 16건의 이상반응 중 의약품과의 관련성이 있는 이상반응은 9건 발생하였다

Table 7. 이상반응의 신체기관별 요약

System Organ Class	Preferred Term	Test (N=39)			Placebo (N=40)			All subjects (N=79)		
		n	%	#	n	%	#	n	%	#
Any System Organ Class		7	17.9	7	7	17.5	9	14	17.7	16
Eye disorders		1	2.6	1	1	2.5	1	2	2.5	2
	Eye swelling	1	2.6	1				1	1.3	1
	Eyelid rash				1	2.5	1	1	1.3	1
Gastrointestinal disorders		5	12.8	5	4	10.0	4	9	11.4	9
	Abdominal discomfort	1	2.6	1	2	5.0	2	3	3.8	3
	Diarrhoea	1	2.6	1	2	5.0	2	3	3.8	3
	Dyspepsia	3	7.7	3				3	3.8	3
General disorders and administration site conditions					1	2.5	1	1	1.3	2
	Hunger				1	2.5	1	1	1.3	
Musculoskeletal and connective tissue disorders		1	2.6	1	1	2.5	1	2	2.5	1
	Arthralgia				1	2.5	1	1	1.3	1
	Musculoskeletal pain	1	2.6	1						
Nervous system disorders					2	5.0	2	2	2.5	2

	Headache				2	5.0	2	2	2.5	2
--	----------	--	--	--	---	-----	---	---	-----	---

n=number of subjects with AEs,

%=percentage of subjects among N,

#=number of AEs

11.4. 중대한 이상반응

본 임상시험에서 중대한 이상반응은 발생하지 않았다.

11.5. 임상검사실 검사

11.5.1. 활력징후

활력징후는 좌위혈압, 심박수, 체온 등의 측정치에서 투약 전 후 임상적으로 의미 있는 변화는 관찰되지 않았다.

11.5.2. 신체검진

모든 시험대상자에서 이상소견은 관찰되지 않았다.

11.5.3. 임상검사실 검사

대부분의 실험실 검사 수치는 정상범위 또는 임상적으로 유의하지 않은 수준의 수치를 나타내었다.

11.6. 안전성에 대한 결론

본 임상시험의 안전성 평가는 무작위배정 받은 후 한번이라도 임상시험용의약품을 복용한 79명(safety 분석군)의 시험대상자를 대상으로 실시하였다. 본 임상시험에서 발생한 이상반응은 대조식품 섭취군 7명에서 9건이 발생하였다. 시험식품 섭취군 7명에서 7건이 발생하였다.

이상반응의 중증도는 경증 또는 중등증이었으며 후유증 없이 회복되었다. 16건의 이상반응 중 의약품과의 관련성이 있는 이상반응은 9건 발생하였다.

임상시험 기간 동안 임상시험용의약품 투여 후 실시한 검사실 검사 결과 대부분의 검사실 검사 수치는 정상범위 또는 임상적으로 유의하지 않은 수준의 수치를 나타내었다. 활력징후, 신체검진에서는 모두 정상 또는 임상적으로 의미 없는 결과였다.

12. 최종 결론

본 인체적용임상시험은 피부 주름이 있는 여성을 대상으로 대조식품(Placebo) 대비 녹차추출물의 유효성 및 안전성을 평가하고, 적정 용량을 결정하고자 하였다

전체 85명이 본 임상시험에 서면 동의하여 선정검사를 받았고, 80명의 시험대상자가 무작위배정 번호를 부여받았으며, 최종적으로 76명이 임상시험을 모두 완료하였다. 유효성 평가는 임상시험을 모두 완료한 76명의 시험대상자가 PP 분석군으로 분류되어 평가에 포함되었고, Safety 분석군은 무작위 배정되어 임상시험용식품을 한 번이라도 적용 받은 79명의 시험대상자가 포함되었다.

피부 주름이 있는 여성을 대상으로 12주간 카테킨 고함유녹차추출물을 복용하였을 때 안전성 평가 결과 중대한 이상반응은 없었으며, 두 섭취군간 유의성있는 차이는 없었다. 따라서 녹차추출물에 섭취에 의한 안전성은 확보되었음을 확인하였다. 1차 유효성평가에서 모사판 (visiometer)을 이용한 주름 측정결과 통계학적으로 유의미한 호전은 보이지 않았으나, 전문가에 의한 눈가 주름 육안 평가는 시험군에서 섭취전 대비 12주 시점의 변화가 통계적으로 유의한 호전을 나타내었다. 2차 유효성평가인 대상자의 주름만족도의 경우 시험군에서 섭취전 대비 12주 시점의 변화는 통계학적으로 유의한 만족도를 나타내었다. 그 외 평가한 대상자의 식품만족도, 피부수분량, 피부수분손실량, 피부색평가에서는 통계적 유의성은 없었다. 이상의 임상 시험결과로 카테킨 고함유녹차추출물은 모사판을 이용한 주름측정결과상 통계적으로 유의미한 호전은 없었으나, 전문가에 의한 눈가주름 육안평가 및 대상자의 만족도에서 통계적으로 유의한 만족도를 나타내어 카테킨 고함유녹차추출물이 주름개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 주 후 카테킨 함량을 높이고, 대상자수를 늘려 연구가 필요할 것으로 사료된다.

13. 참고문헌

- 1) Afzal M1, Safer AM, Menon M, "Green tea polyphenols and their potential role in health and disease." *Inflammopharmacology*. 2015 Aug;23(4):151-61.
- 2) Relat J, Blancafort A, Oliveras G, Cufi S, Haro D, Marrero PF, Puig T., "Different fatty acid metabolism effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate and C75 in adenocarcinoma lung cancer." *BMC Cancer*. 2012 Jul 6;12:280.
- 3) Mielgo-Ayuso J, Barrenechea L, Alcorta P, Larrarte E, Margareto J, Labayen I, "1.

Effects of dietary supplementation with epigallocatechin-3-gallate on weight loss, energy homeostasis, cardiometabolic risk factors and liver function in obese women: randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial." *Br J Nutr.* 2014 Apr 14;111(7):1263-71.

4) Chen, I.J.; Liu, C.Y.; Chiu, J.P.; Hsu, C.H., "Therapeutic effect of high-dose green tea extract on weight reduction: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial." *Clin. Nutr.* 2015.

5) Suliburska, J.; Bogdanski, P.; Szulinska, M.; Stepień, M.; Pupek-Musialik, D.; Jablecka, A. "Effects of green tea supplementation on elements, total antioxidants, lipids, and glucose values in the serum of obese patients." *Biol. Trace Elem. Res.* 2012, 149, 315-322.

6) Alison F. Stallings, Mary P. Lupo, "Practical Uses of Botanicals in Skin Care." *J. Clin Aesthet Dermatol.* 2009 January; 2(1): 36-40.

7) Fatemeh Hajiaghaalipour, M. S. Kanthimathi, Mahmood Ameen Abdulla, and Junedah Sanusi, "The Effect of *Camellia sinensis* on Wound Healing Potential in an Animal Model." *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013; 2013: 386734.

8) Im M, Kim SY, Sohn KC, Choi DK, Lee Y, Seo YJ, Kim CD, Hwang YL, Zouboulis CC, Lee JH. "Epigallocatechin-3-gallate suppresses IGF-1-induced lipogenesis and cytokine expression in SZ95 sebocytes." *J Invest Dermatol.* 2012 Dec;132(12):2700-8.

9) Young-Jung Lee, Dong-Young Choi, Im Seop Choi, Ki Ho Kim, Young Hee Kim, Hwan

Mook Kim, Kiho Lee, Won Gil Cho, Jea Kyung Jung, Sang Bae Han, Jin-Yi Han, Sang-Yoon Nam, Young Won Yun, Jae Hwang Jeong, Ki-Wan Oh, Jin Tae Hong, "Inhibitory effect of 4-O-methylhonokiol on lipopolysaccharide-induced neuroinflammation, amyloidogenesis and memory impairment via inhibition of nuclear factor-kappaB in vitro and in vivo models." *J Neuroinflammation*. 2012; 9: 35.

10) P. Mecocci, C. Tinarelli, R. J. Schulz, and M. C. Polidori, "Nutraceuticals in cognitive impairment and Alzheimer's disease." *Front Pharmacol*. 2014; 5: 147.

11) Mielgo-Ayuso J1, Barrenechea L2, Alcorta P3, Larrarte E4, Margareto J4, Labayen I1. "Effects of dietary supplementation with epigallocatechin-3-gallate on weight loss, energy homeostasis, cardiometabolic risk factors and liver function in obese women: randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial." Effects of dietary supplementation with epigallocatechin-3-gallate on weight loss, energy homeostasis, cardiometabolic risk factors and liver function in obese women: randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *British Journal of Nutrition*. 2014 Apr 14;111(7):1263-71.

12) Igho Onakpoya, Shao Kang Hung, Rachel Perry, BarbaraWider, and Edzard Ernst, "The Use of Garcinia Extract (Hydroxycitric Acid) as a Weight loss Supplement: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomised Clinical Trials." *Journal of Obesity*, Vol 2011, Article ID 509038, P.9, 2011

13) Margit M. McGowan, Burton L. Eisenberg, Lionel D. Lewis, Heather M. Froehlich, Wendy A. Wells, Alan Eastman, Nancy B. Kuemmerle, Kari M. Rosenkrantz, Richard J. Barth Jr., "A proof of principle clinical trial to determine whether conjugated linoleic acid modulates the lipogenic pathway in human breast cancer tissue." *Breast Cancer Res Treat*. 2013 February ; 138(1): 175-183.

[부록]IRB 임상시험승인통지서

CNUH201712002001-HE005

2018.12.23 개정본



통지서

※ 본 과제와 문서보존기간은 3년입니다.

수신	의뢰(지원)기관	(주)달향오식품			
신	연구책임자	피부과 이엽			
IRB File No.	CNUH	심사내용	시경계획서	통지일자	2018.01.09
	2017-12-002-001				
연구과제명	국문	독자주출발의 피부 주름 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조 인체적용시험			
	영문				
임상시험코드		Study Nick Name			

연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물 <input type="checkbox"/> 생물학적 제제 <input type="checkbox"/> 세포치유제 <input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품 <input type="checkbox"/> 의료시술 <input type="checkbox"/> 의료기기 (<input type="radio"/> 1등급 <input type="radio"/> 2등급 <input type="radio"/> 3등급 <input type="radio"/> 4등급) <input type="checkbox"/> 해당사항 없음					
연구분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구 <input type="checkbox"/> 인체유래물(검체)연구 <input type="checkbox"/> 의무기록연구 <input type="checkbox"/> 유전자연구 <input type="checkbox"/> 유전자 치료 <input type="checkbox"/> 배아연구 <input type="checkbox"/> 배세포복제배아연구 <input type="checkbox"/> 줄기세포주연구 <input type="checkbox"/> 기타 ()					
연구분류3	<input checked="" type="radio"/> 전향적 연구 <input type="radio"/> 후향적 연구 <input type="radio"/> 전향적 & 후향적 병행연구					
연구분류4	<input checked="" type="checkbox"/> 중재연구 <input type="checkbox"/> 설문조사 <input type="checkbox"/> 차등분석 및 분석연구 <input type="checkbox"/> 관찰연구 (<input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 환자대조군연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구) <input type="checkbox"/> 기타 ()					
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)					
일반명			상품명			
전체시험자총예수	전체	80 명	국내	80 명	공형	80 명
연구승인기간	2018.01.09 ~ 2019.01.08					
지원의뢰기관	기관명	(주)달향오식품	대표(직위)	성명	류건식	
제출서류목록	(첨부) 변경대비표(Table of Changes) [] [] (첨부) 연구대상자 설명문 및 동의서(ICF) [V1.1] [] (첨부) 연구계획서(Protocol) [V1.1] []					

관련근거	평가일자	2018.01.09
중간보고시기	비고	
심사결과	● 승인 ○ 시정승인 -초기심의 시정사항에 대한 시정계획서 승인함 -연구 예정기간: 2018년 09월 09일(PRB 승인일) ~ 2019년 08월 08일 (1년) -중간보고주기: 해당없음 (연구 종료 후 30일 이내에 종료보고서 제출 필요) -연구계획서 및 대상자 설명문 내 Version 오기를 수정하시기 바랍니다.	

- ※ 본 위원회는 국제임상시험윤리원(ICM) 및 임상시험관리기준(GCP)을 준수합니다.
- ※ 승인 받은 연구대상자 동의서(CNUHPRB가 제공 발인된 동의서)를 사용해야 합니다. 모국어가 한국어가 아닌 대상자들에게는 승인된 동의서를 연구대상자의 모국어로 인공번역본을 사용할 것이며, 이러한 동의서 번역본은 반드시 위원회의 승인을 받아야 합니다.
- ※ 위원회의 승인은 1년을 초과할 수 없습니다. 1년 이상연구를 지속하고자 하는 경우에는 반드시 연구와 관련된 중간보고서를 제출하여야 합니다. 연구에 따른 중간보고 기간을 반드시 확인해 주십시오. 연구종료 시에는 종료 및 결과보고서를 작성하여 제출해주시기 바랍니다.
- ※ 초기심의 후 3개월 이내에 시정 및 보완 사항에 대한 답변 미 제출시 심의 취소가 되오니 반드시 기한을 엄수하시기 바랍니다.
- ※ 연구 도중에 예상치 못한 중대한 이상반응 발생 시 연구책임자는 본위원회에 즉시 보고 해야 합니다.
- ※ 연구진행에 있어 연구대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고 연구의 어떠한 변경이든 위원회의 사전 승인을 받고 수행하여야 합니다. 연구대상자들의 보호를 위해 위대한 위험 상황에서의 변경도 즉각 위원회에 보고하여야 합니다.
- ※ 연구 개시 및 연구대상자 모집은 연구과제 승인 이후에 가능합니다.
- ※ 연구책임자는 식품의약품안전처의 인허가 및 관리를 받는 연구는 식품의약품안전처의 해당 건에 대한 실머조사 이후 6개월 이내에, 식품의약품안전처의 인허가 대상이 아닌 연구는 연구종료로 결과보고에 대한 심의 환요 시점에서 6개월 이내에 임상시험 관련문서 중 보존이 요구되는 문서를 문서보관책임자에게 인계하여야 합니다.
- ※ 위원회의 연락처: 충남대학교병원 임상시험심사위원회 042) 280-6715

충남대학교병원 의학연구윤리심의위원장



[부록] IRB 임상시험승인통지서

CNUH 2017년 2002001-HB006

2018.12.29 제정본



통지서

* 본 과제의 심사보조기간은 3 년 입니다.

수 신	의회(지원)기관	(주)알앤오씨콤				
	연구책임자	피부과 이영				
IRB File No.	CNUH 2017-12-002-001	심사내물	시험계획서	결정일자	2018.01.09	
연구과제명	국문	복합주용량의 피부 주름 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중 눈가림, 위약대조 인체적용시험				
	영문					
임상시험코드	Study Nick Name					

연구분류1	<input type="checkbox"/> 약물	<input type="checkbox"/> 생물학적 제제	<input type="checkbox"/> 세포치료제	<input checked="" type="checkbox"/> 건강기능식품		
	<input type="checkbox"/> 의료기술	<input type="checkbox"/> 의료기기 (<input type="radio"/> 1등급 <input type="radio"/> 2등급 <input type="radio"/> 3등급 <input type="radio"/> 4등급)	<input type="checkbox"/> 해당사항 없음			
연구분류2	<input checked="" type="checkbox"/> 인간대상연구	<input type="checkbox"/> 인체유연성(검체)연구	<input type="checkbox"/> 컴퓨터모형연구			
	<input type="checkbox"/> 유전자연구	<input type="checkbox"/> 무전자 치료				
	<input type="checkbox"/> 태아연구	<input type="checkbox"/> 생체보호제/태아연구	<input type="checkbox"/> 용기보호수연구			
	<input type="checkbox"/> 기타 ()					
연구분류3	<input checked="" type="radio"/> 전향적 연구	<input type="radio"/> 후향적 연구	<input type="radio"/> 전향적 & 후향적 병행연구			
연구분류4	<input checked="" type="checkbox"/> 임상연구	<input type="checkbox"/> 설문조사	<input type="checkbox"/> 자료분석 및 통계연구			
	<input type="checkbox"/> 관찰연구 (<input type="checkbox"/> 단면조사연구 <input type="checkbox"/> 환자대상조연구 <input type="checkbox"/> 코호트 연구)					
	<input type="checkbox"/> 기타 ()					
연구분류5	<input type="checkbox"/> 인간을 대상으로 하지 않는 연구 Non-clinical study (in vitro, in vivo preclinical study)					
일반명			상품명			
전체시험자총예수	한계	00 명	국내	00 명	외국	00 명
연구승인기간	2018.01.09 ~ 2019.01.09					
지원 의회기관	기관명	(주)알앤오씨콤	대표(직위)	성명	직책	
제출서류목록	<input type="checkbox"/> (첨부) 변경대비표(Table of Changes) [] <input type="checkbox"/> (첨부) 연구대상자 설명문 및 동의서(OCF) [VI.1] [] <input type="checkbox"/> (첨부) 연구계획서(Protocol) [VI.1] []					

CNUH2017기2002001-HE005

2018.12.23 재검본

관련근거	발기일자	2018.08.09
중간보고서기	비고	
심사결과	● 승인 ○ 시정승인 -초거십의 시정시정해 대한 시정지침서 승인함 -연구 체결기간: 2018년 08월 09일(RRB 승인일) - 2019년 08월 08일 (1년) -중간보고주기: 해당달음 (연구 종료 후 30일 이내에 종료보고서 제출 필요) -연구제책서 및 대상자 설명문 내 Version 오거를 수정하시기 바랍니다.	

- * 본 위원회는 국제임상시험협의회(ICH) 및 임상시험관리기준(GCP)을 준수합니다.
- * 승인 받은 연구대상자 동의서(CNUHRB)가 청공 날인된 동의서)를 사용해야 합니다. 외국어가 한국어 미만 대상자용회계는 승인된 동의서를 연구대상자의 모국어로 인공된 번역본을 사용할 것이며, 이러한 동의서 번역본은 반드시 위원회의 승인을 받아야 합니다.
- * 위원회의 승인은 1년을 초과할 수 없습니다. 1년 이상연구를 지속하고자 하는 경우에는 반드시 연구와 관련된 중간보고서를 제출하여야 합니다. 연구에 따른 중간보고 기간을 반드시 확인해 주십시오. 연구종료 시에는 종료 및 결과보고서를 작성하여 제출해주시기 바랍니다.
- * 초기십의 후 3개월 이내에 시정 및 보완 사항에 대한 답변 이 제출시 승의 취소가 되오니 반드시 기한을 준수하시기 바랍니다.
- * 연구 도중에 예상치 못한 중대한 이상반응 발생 시 연구책임자는 발령원회에 즉시 보고 해야 합니다.
- * 연구진행에 있어 연구대상자를 보호하기 위해 불가피한 경우를 제외하고 연구의 어리한 변경미은 위원회의 사전 승인을 받고 수행하여야 합니다. 연구대상자들의 보호를 위해 위대한 응급 상황에서의 변경도 즉시 위원회에 보고 해야 합니다.
- * 연구 개시 및 연구대상자 모집은 연구과제 승인 이후에 가능합니다.
- * 연구책임자는 식품의약품안전처의 인허가 및 관리를 받는 연구는 식품의약품안전처의 해당 견해 대한 일러조서 이 후 6개월 이내에, 식품의약품안전처의 인허가 대상이 아닌 연구는 연구종료후 결과보고에 대한 승의 판공 시점에서 6개월 이내에 임상시험 관련문서 등 보존이 요구되는 문서중 문서보관책임자에게 인계하여야 합니다.
- * 위원회와 연락방법 : 충남대학교병원 임상시험심사위원회 042) 260-6715

충남대학교병원 의학연구윤리심의위원회장



제11절 건기식 고시형원료서의 EGCG 고함유 녹차소재

1. 식품의약품안전처 건강기능식품 고시형원료 녹차추출물

가. 제조기준

- (1) 원재료 : 녹차(*Camellia sinensis*, *Thea sinensis*) 잎
- (2) 제조방법 : 상기 (1)의 원재료를 물 또는 주정(물·주정 혼합물 포함), 초에 킬로 추출 후 여과하여 제조하여야 함
- (3) 기능성분(또는 지표성분)의 함량 : 카테킨을 200 mg/g 이상 함유하고 있어야 함. 카테킨은 에피갈로카테킨((-)-epigallocatechin, EGC), 에피갈로카테킨갈레이트((-)-epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨((-)-epicatechin, EC) 및 에피카테킨갈레이트((-)-epicatechin gallate, ECG) 합계량으로 환산하며 4가지 카테킨이 모두 확인되어야 함. 다만, 최종제품의 경우 4가지 카테킨을 모두 확인할 필요는 없음

나. 규격

- (1) 성상 : 고유의 색택과 향미를 가지며 이미·이취가 없어야 함
- (2) 카테킨
 - (가) 원료성 제품 : 표시량 이상
 - (나) 최종제품 : 표시량의 80 ~ 120%
- (3) 카페인(mg/kg) : 50,000 이하
- (4) 잔류용매(mg/kg) : 50.0 이하(초산에틸을 사용한 경우)
- (5) 대장균군 : 음성

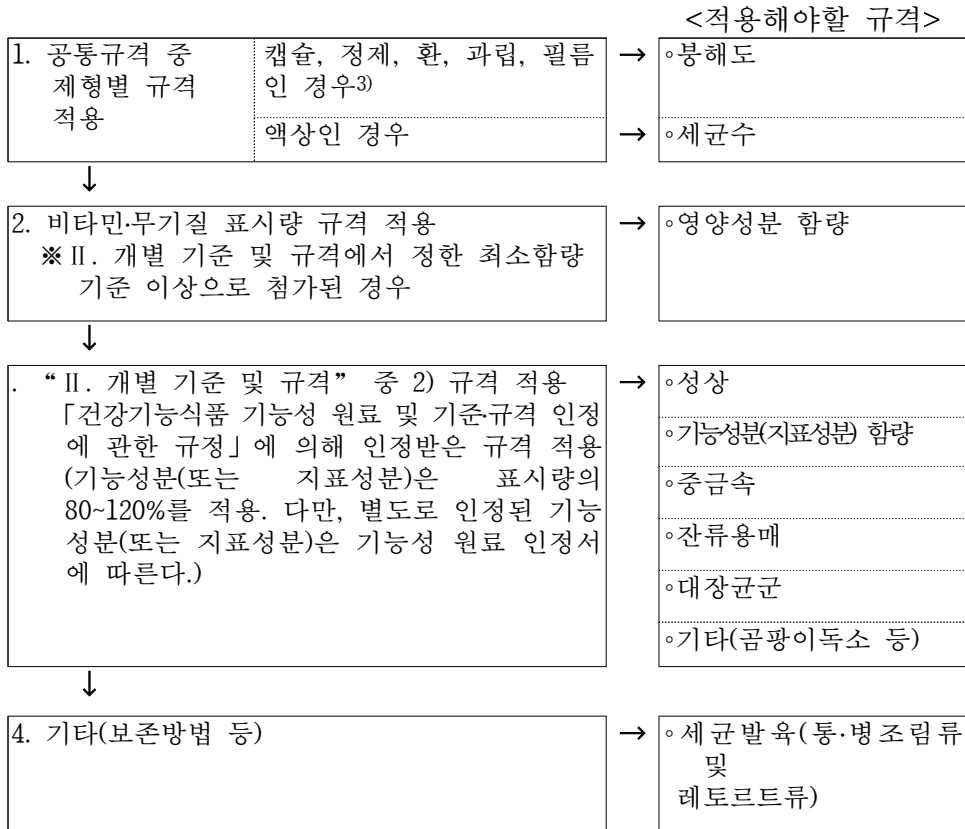
다. 최종제품의 요건

- (1) 기능성 내용 : 항산화·체지방 감소·혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음
- (2) 일일섭취량
카테킨으로서 0.3~1.0 g [에피갈로카테킨갈레이트((-)-epigallocatechin gallate, EGCG) 300 mg 이하]
- (3) 섭취 시 주의사항
 - (가) 어린이, 임산부 및 수유부는 섭취를 피할 것
 - (나) 간질환이 있거나 의약품 복용 시 전문가와 상담할 것
 - (다) 카페인이 함유되어 있어 초조감, 불면 등을 나타낼 수 있음
 - (라) 식사 후 섭취할 것
 - (마) 카페인을 함유한 식품의 섭취에 주의할 것
 - (바) 이상사례 발생 시 섭취를 중단하고 전문가와 상담할 것

라. 시험법

- (1) 카테킨 : 제 4. 3-47 카테킨
- (2) 카페인 : 제 4. 2-5-2 카페인
- (3) 잔류용매 : 제 4. 2-5-5 초산에틸
- (4) 대장균군 : [별표 4] 참조

[표] 건강기능식품의 기준 및 규격 적용 절차



2. EGCG 고함유 녹차소재를 고시형원료 녹차추출물로 승인

- 가. EGCG 고함유 녹차추출물(EGTE) 소재는 개발 초기(2015.10) 식약처의 권고에 따라 개별인정형 목표를 두고 연구과제를 시작하였으나 2017년 말 식약처에서 녹차추출물의 안전성 및 기능성 재평가 결과를 내놓으면서 본 소재와 유사한 DSM사의 개별인정형원료 고농축녹차추출물(EGCG ~90%)을 고시형으로 변경, 승인한 사실을 접하게 됨에 따라 본 소재에 대해서도 고시형 원료로의 승인 검토를 요청하여 고시형으로 변경, 승인을 받게 되었다.
- 나. 본 녹차소재를 고시형으로 승인한 식약처 국민신문고의 답변내용을 아래에 첨부하였으며 식약처에 이 고시형 녹차추출물의 품목제조신고를 신청하여 등록, 처리하였다
- 다. 따라서 본 EGCG 고함유 녹차추출물(EGTE)이 고시형원료로 인정됨에 따라 본 과제에서 추진하는 신규 기능성에 대해 <개별인정>이 아닌 <기능성 추가>로 승인을 취득하게 될 것이다.

처리 결과 알림

신청번호	1AA-1810-134595
신청일	2018-10-10 10:46:32
신청인 구분	기업
기업명(상호)	(주)알앤오식품
신청인이름	류○○
주민(외국인)번호	
연락처	
휴대전화	
주소	전라북도 완주군 봉동읍
이메일	
공개여부	비공유
진행상황 통보방식	진행상황통지방식(전자우편), 민원답변통지방식(전자우편)
민원제목	녹차추출물 고시형 건강기능식품 원료 기준에 적합한지 답변 부탁드립니다
민원내용	

사
483
-
-
86
-
-
002
16
호

(*첨부한 파일을 참조하시면 더욱 편리하게 검토하실 수 있습니다.)

1. 업체명

(주)알앤오식품

2. 원료명

녹차추출물

3. 질의 내용

녹차추출물을 이용하여 건강기능식품 개발 진행 중인 (주)알앤오식품입니다. 저희가 개발한 녹차추출물이 고시형 건강기능식품 기준에 적합한지 문의 드립니다.

기존 고시형 녹차추출물은 「건강기능식품의 기준 및 규격」2-6에 등재되어 있으며, 다음의 제조기준, 규격이 설정되어 있습니다.

1) 제조기준

(1) 원재료 : 녹차(Camellia sinensis, Thea sinensis) 잎

(2) 제조방법 : 상기 (1)의 원재료를 물 또는 주정(물․주정 혼합물 포함), 초산에틸로 추출 후 여과하여 제조하여야 함

(3) 기능성분(또는 지표성분)의 함량 : 카테킨을 200 mg/g 이상 함유하고 있어야 함. 카테킨은 에피갈로카테킨((-)-epigallocatechin, EGC), 에피갈로카테킨갈레이트((-)-epigallocatechin gallate, EGCG), 에피카테킨((-)-epicatechin, EC) 및 에피카테킨갈레이트((-)-epicatechin gallate, ECG) 합계량으로 환산하며 4가지 카테킨이 모두 확인되어야 함. 다만, 최종제품의 경우 4가지 카테킨을 모두 확인할 필요는 없음

2) 규격

(1) 색상 : 고유의 색택과 향미를 가지며 이미․이취가 없어야 함

(2) 카테킨

(가) 원료성 제품 : 표시량 이상

(나) 최종제품 : 표시량의 80 ~ 120%

(3) 카페인(mg/kg) : 50,000 이하

(4) 잔류용매(mg/kg) : 50.0 이하(초산에틸을 사용한 경우)

(5) 대장균군 : 음성

한편, 저희 녹차추출물의 상세 제조공정, 지표성분 함량 및 규격은 다음과 같습니다(아래의 상세 제조공정 및 지표성분 함량 등 자료는 기밀사항임).

1) 제조공정

(1) 제조공정 (2) 공정, 식품, 식품첨가물 (3) 지표성분함량변화(mg/g) (4) 수율(%)

원재료 녹차(Gamellia sinensis) 건엽 EGCG 40~50 mg/g
100%

↓

추출/농축 열수추출(65°C, 6hr) 후 감압 농축 90~110 mg/g
38%

↓

분배/농축 물(H₂O)-초산에틸(EA) 반복 분배 170~230 mg/g
18%

후, 상층(EA) 감압농축

↓

여과/농축 대공극성수지(Diaion HP-20) 820~980 mg/g
7.6%

↓ 크로마토그래피(수용성 주정) 후

분획물별 감압농축

건조 EGCG고함유분획물의 940~980 mg/g 5.1%

동결건조(백색분말)

2) 지표성분의 함량

구성성분 EGC Caffeine EC EGCG ECG total catechins

비율(%) 0.01~1.0 0~0.1 0.01~1.0 95.0~98.0 0.1~5.0 ~100

3) 규격

(1) 색상 : 고유의 색택과 향미를 가지며 이미.이취가 없음

(2) 카테킨(mg/g) : 950 이상

(3) 카페인(mg/kg) : 없음

(4) 잔류용매(mg/kg) : 8.0 이하(초산에틸을 사용하였으며 허용기준치 이하임)

(5) 대장균군 : 음성

요약하자면, 녹차 건엽을 열수 추출, 초산에틸(EA)로 분배 후 여과[대공극성수지(Diaion HP-20) 충전제, DSM사 고농축 녹차추출물의 제조공정과 동일]하여 농축, 마지막으로 분말화 공정을 통해 제조하게 됩니다. 최종 원료의 기능성 성분 카테킨의 함량은 200mg/g 이상이고 EGCG로서 950~980 mg/g 함유되어 있으며, 4개 카테킨이 모두 확인됩니다. 또한 카페인도 없으며, 잔류용매 초산에틸(EA)은 허용기준치 이하입니다.

3~4년 전부터 본 녹차추출물의 개별인정형 원료를 목표로 개발을 진행해 왔으나 인허가 신청 제출에 앞서 본 소재가 고시형 건강기능식품 기준에 적합한지, 아니면 개별인정형 이어야 하는지 확인이 필요한 상황입니다. 저희로서는 앞으로 추가로 들어갈 개발 자금의 절약과 시간을 단축할 수 있는 기회가 될 것입니다. 따라서 저희가 개발한 녹차추출물 소재가 고시형 건강기능식품 기준에 적합한지 명료한 답변을 부탁드립니다.

첨부파일



온라인상담_질의내용(2).docx

처리 결과

처리기관 정보

▶ [입원민원으로 가기](#)

처리기관 식품의약품안전처 식품안전정책국 식품기준기획관 식품기준과

담당자 김○○

민원인 신청번호 1AA-1810-134595

접수일 2018-10-10 10:47:07

처리기관 접수번호

2AA-1810-167129

처리예정일 2018-10-18 23:59:59

민원처리기간은 최종 민원 처리 기관의 접수일로부터 보통 7일 또는 14일임.
(해당 민원을 처리하는 소관 법령에 따라 달라질 수 있음)

처리결과(답변내용)

기업민원신청으로 행정기관에서 불이익을 당한 경우

- 만족도 조사에서 불만족을 체크하고 불이익을 받았다고 명시하거나
- 다시 민원을 신청하면서 해당기관 또는 부서에 배정되지 않도록 기피신청을 하실 수 있습니다.

※ '기피신청'이란?

- 불친절신고 또는 부당한 민원 처리 등으로 인하여 민원을 제출할 경우, 공정한 민원 처리를 위해 기피 대상을 명시하도록 함으로써 신고대상 기관(부서)으로 분류·처리되지 않도록 하기 위한 제도

답변일 2018-10-18 17:04:26

처리결과(답변내용)

1. 안녕하십니까 ? 우리 처 국민신문고를 방문하여 주셔서 감사합니다 .

2. 귀하께서 질의하신 내용에 관하여 아래와 같이 답변 드립니다 .

가 . 귀하의 민원내용은 건강기능식품의 기준 및 규격 등에 관한 것으로 이해하고 답변드리도록 하겠습니다 .

나 . 녹차추출물은 「 건강기능식품의 기준 및 규격 」 제 3, 2-6 녹차추출물의 제조기준에 따라 녹차 (Camellia sinensis, Thea sinensis) 잎을 물 또는 주정 (물·주정 혼합물 포함) , 초산에틸로 추출 후 여과하여 제조하여야 하며 , 기능성분 (또는 지표성분) 인 카테킨의 함량이 200 mg/g 이상 함유하고 , EGC, EGCG, EC, ECG 의 합계량으로 환산하며 4 가지 카테킨이 모두 확인되어야 합니다 .

다 . 귀하께서 질의하신 제조방법은 상기 규정에 적합한 것으로 판단되나 , 녹차추출물 최종제품 제조 시 일일섭취량의 카테킨 함량 중 에피갈로카테킨갈레이트 ((-)-epigallocatechin gallate, EGCG) 는 300 mg 이하이어야 함을 알려드리니 참고하시기 바랍니다 .

라 . 참고로 , 우리처 홈페이지 (<http://www.mfds.go.kr>) 및 식품안전나라 (<http://www.foodsafetykorea.go.kr>) 를 이용하시면 식품 관련 규정 및 정보를 보다 편리하게 이용하실 수 있습니다 .

3. 귀하의 질문에 만족스러운 답변이 되었기를 바라며 , 답변 내용에 대한 추가 설명이 필요한 경우 , 식품의약품안전처 식품기준과 김현정 (043-719-2439) 에게 연락주시면 친절히 안내해 드리도록 하겠습니다 . 감사합니다 .

붙임 민원신청서 1 부 . 끝 .

첨부파일 첨부파일 없음

② 민원처리과정 만족도조사 - 식품의약품안전처 -

⚠ 이미 만족도조사에 응모하셨을 경우 다시 응모할 수 없습니다.
만족도 행거의 적극적인 참여를 부탁드립니다.

민원처리과정에 대해 만족하십니까?(필수)

매우 만족 ★★★★★ 만족 ★★★★★ 보통 ★★★★★
 불안 ★★★★★ 매우 불안 ★★★★★

만족 또는 불만족하신 사유 등 의견이 있으시면 작성해 주시기 바랍니다.
(2000자 이내)

귀하가 신청하신 민원은 해결되었습니까?

해결 ★★★★★ 부분해결 ★★★★★ 미해결 ★★★★★

등록 초기화

이메일 주소를 변경하시려면, [나의 이용내역 > 정보관리](#)에서 수정하시면 됩니다.
본 메일을 발신전용 메일이므로 회신을 통한 문의는 처리되지 않습니다.
문의사항은 이용문의를 이용하여 주시기 바랍니다.

(30102) 세종특별자치시 도움5로 20 정부세종청사 국민권익위원회
대표전화 (국번없이) 110 / 사이트 관련 이용문의 : 1600-8172 상담안내 09:00~18:00(평일)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 1차년도(2016.11.29.-2017.11.28.)

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도	기여도
원료 표준화 및 규격화 설정	고순도 EGCG소재 생산	3회에 거쳐 반복 생산	100%	
	반제품, 완제품의 순도, 품질, 수율의 동등성 생산 조건 확립	각 공정단계의 수율 향상 조건 확립, 반제품 혹은 완제품에 대한 품질 성적서를 공인기관에서 발급받음, 완제품에 대한 배합조건 최종 결정	100%	
	안정성 및 기능성에 적합한 규격 설정	지표성분 정량분석법 및 분석법 벨리데이션, 유해성분 (카페인)의 정량시험법 설정	100%	
EGCG소재 안정성평가 및 품질검사	소재 안정성 평가: 온도, 습도, 광도에 안정한 유효 기간 설정	분말은 어떤 조건에서도 안정함 반면 수용액 상은 저온에서 안정한 편이나 상온에서는 7~10일 경과 후 부터는 변질 가능성(유효기간설정)	100%	
	이화학적특성 및 품질검사	지표성분 정량시험, 유해성분 정량시험 등 인증기관 성적서 확보	100%	
피부건강 효능실험을 세포실험 (<i>In vitro</i>) 및 동물실험 (<i>In vivo</i>)을 통해 평가	①DPPH 소거능항산화 활성 ②Collagenase저해활성측정 ③사람 각질형성 세포 HaCat세포주에서피부주름 개선에 미치는 효과 ④MTT assay에 의한 세포 생존율/증식 측정 ⑤MMP mRNA real-time PCR/Western blot 분석 ⑥MMP-1 활성저해도 ELISA 평가	①DPPH자유라디칼소거능은 10 ug/ml 부터 200 ug/ml의 농도로 평가하였을 때 16.8% 부터 83.7% 활성을 보임 ②Collagenase 활성은 800 ug/ml 농도에서 85% 억제 ③10 ug/ml에서 400 ug/ml의 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않았음 ④MMP-1, 9, 13 효소활성을 농도 의존적으로 억제 ⑤TNF- α , IL-6 mRNA 발현을 감소 ⑥MMP-1 단백질 발현 감소	100%	

제2절 2차년도(2017.11.29.-2018.11.28.)

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도	기여도
최적 제조 공정 방안 확립 및 시제품개발	공정표준화(SOP) 작업 (공정 단계별 최적조건 검토)	주요 공정(용매분배, 분획화, 재결정화)의 수율 제고를 위한 개선 방안을 제시하였음	95%	
	제제화및제형화 연구 (소재의 형상, 형태 등 결정)	소재의 유효성을 유지하면서 캡슐 충진을 용이하게 할 수 있는 제형 및 제제를 검토하였음	95%	
	시생산및시제품제작 (임상시험 시험제품 생산 및 시제품 제작)	임상시험약 및 소재 시제품을 생산하여 시험기관 및 타사에 제공하였음	95%	
피부건강개선 인체적용시험	적정용량시험(안전성 평가 위한 적정용량시험 실시)	제시한 섭취량(190mg)이 안전성 차원에서 적정한 용량인지를 검토하였음	95%	
	인체적용시험 (80명 피험자 대상 실시)	주름억제시험(진약 40명, 위약40명)을 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조로 인체적용시험 개시함	100%	
	CRO모니터링(임상시험 모니터링 및 관리)	시험 진행사항을 관리 2018.11.26.일자 마지막 피험자 방문으로 시험종료 예정임	100%	

제3절 3차년도(2018.11.29.-2019.11.28.)

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도	기여도
상용화 위한 제품개발 완성도 제고	소재의 점진적 양산화	녹차원료(0.1톤, 0.5톤, 2톤, 5톤 등)를 점진적으로 늘려가면서 생산 노하우를 축적함	100%	
	제품 네이밍 개발	기능성과 스토리텔링이 가능한 상품명 개발(알오고)	100%	
	제품디자인 개발	브랜드 및 패키지디자인, 포장(단상자)디자인 등 개발	100%	
	전문가평가회 및 홍보	제조공정, 제품디자인, 마케팅 등의 전문가를 초빙하여 객관적 평가를 받고 조언을 구함	80%	
	IND평가(비만클리닉)	한방 비만학회에 의뢰하여 비만클리닉 고객(환자)들을 대상으로 마황(에페드린) 대체제로서의 가능성 타진 중임	80%	
피부주름억제 임상시험	인체적용시험 결과 분석	80명 피험자 대상에 대한 시험결과 분석 및 통계처리하였으나 유의적 효능으로 평가받지 못하였으나 안전성은 인정되었음(추가 분석 중)	100%	
	-임상시험 CRO모니터링 및 관리	결과보고서 작성	100%	

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연구개발 성과

1. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI 여부	게재일	등록번호
1	Epigallocatechin-3-Gallate-Rich Green Tea Extract Ameliorates Fatty Liver and Weight Gain in Mice Fed a High Fat Diet by Activating the Sirtuin 1 and AMP Activating Protein Kinase Pathway	The American Journal of Chinese Medicine	배유진	48(3) 1-15	미국		SCI	2018.02.02	
2	신규 건강기능식품소재 EGCG 고함유 녹차추출물(EGTE)의 장기안정성 평가	한국생약학회지	유시용	49(4) 328-335	한국		비SCI	2018.12.17	
3	각질형성세포에서 mmp-1 활성 및 자외선 유도 무모취 피부손상에 대한 카테킨 고함유 녹차추출물의 영향	한국약용작물학회지	김승형	27(2) 143-150	한국		비SCI	2019.04.16	
4	Epigallocatechin gallate 고함유 녹차추출물의 제조공정 개선	한국생약학회지	류건식	50(3) 198-204	한국		비SCI	2019.09.27	

2. 국내/제 학술회의 발표

No	회의명칭	발표내용	발표일시	장소	국명
1	건강기능식품 국제학술대회	Mass-production and safety studies of highly pure EGCG98 as a nutraceutical	2017.10.22.~ 2017.10.25	세만금컨벤션센터	영어
2	차학회	녹차 유래 고순도 EGCG소재의 대량 생산 및 안전성연구	2017.10.22	경남 하동	한국어
3	차학회	건강기능식품 소재 EGCG고함유 녹차추출물의 안정성(stability)연구	2018.06.09	서울 코엑스	한국어
4	차학회	건강기능식품 소재 EGCG고함유 녹차추출물의 표준화 및 규격화	2018.06.09	서울 코엑스	한국어
5	한국식품영양과학회	EGCG고함유 녹차추출물의 피부주름 개선 및 보습증진에 관한 연구	2018.10.31	부산 벡스코	한국어
6	한국식품영양과학회	EGCG고함유 녹차추출물의 체지방 조절 기능에 대한 연구	2018.10.31	부산 벡스코	한국어
7	한국식품영양과학회	무관주건에 따른 건강기능식품 신규소재 EGCG고함유 녹차추출물의 안정성 연구	2018.10.31	부산 벡스코	한국어
8	한국식품영양과학회	건강기능식품 신규소재 EGCG고함유 녹차추출물의 규격화 및 표준화 연구	2018.10.31	부산 벡스코	한국어
9	차학회	탈카페인, 카테킨 함유 녹차추출물의 체지방감소	2019.06.14	서울 코엑스	한국어
10	차학회	탈카페인, 카테킨 함유 녹차추출물의 인지능력개선	2019.06.14	서울 코엑스	한국어
11	차학회	탈카페인, 카테킨 함유 녹차추출물의 피부주름개선	2019.06.14	서울 코엑스	한국어
12	차학회	탈카페인, 카테킨 함유 녹차추출물의 항당뇨	2019.06.14	서울 코엑스	한국어

3. 전시 및 홍보

No	행사명/신문잡지명	발표내용	목적	일시
1	국제건강기능학회/새만금컨벤션센터	EGCG소재 원료제품 전시	전시	2017.10.22-26
2	한국영양과학회/부산백스코	EGCG소재 원료제품 전시	전시	2018.10.29-31
3	시사뉴스타임 3월호	녹차 유래 천연소재로 건기식 틈새시장 넓혀간다!	홍보	2017.03.01
4	피플투데이 9월호	비만과 노화의 적, EGCG를 만나다	홍보	2017.09.06
5	피플투데이 2월호	바이오품산업의 미래를 열어가는기업	홍보	2019.02.01
6	동아일보/일간지	녹차추출물 '카테킨'으로 피부관리-다이어트 한번에 한다	홍보	2019.04.10

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

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	탈카페인 및 초고순도 에피갈로카테킨 갈레이트의 양산방법	대한민국	㈜알앤오 식품	2019.09.16	10-2019-0113722				100%
2	에피갈로카테킨 갈레이트를 유효성분으로 함유하는 피부주름개선용 조성물	대한민국	㈜알앤오 식품	2019.10.01	10-2019-0121437				100%

5. 저작권(소프트웨어, 서적 등)

No	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록번호	저작권자명	기여율

6. 전문연구 인력양성

No	분류	기준 년도	현 황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	연구원2명 (천세인/허은지)	2017		2				2		2				
2	연구원3명 (천세인/허은지/윤민지)	2018		3				3		3				
3	연구원3명 (윤민지)	2019		1				1		1				

7. 산업기술 인력양성

No	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육개최회수	총 교육시간	총 교육인원
1						
2						

8. 기술거래(이전) 등

No	기술이전 유형	기술실시계약명	기술실시 대상기관	기술실시 발생일자	기술료 (당해연도 발생액)	누적 징수현황
1	직접실시	에피갈로카테킨감량에 특유 유효성분으로 함유하는 피부주름억제 개선용 조성물	(주)알앤오식품	2019.11.06	6,580천원 ()	

9. 사업화 투자실적

No	추가 R&D 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자자금 성격
1		내부자금(4.6억)		6.6억	
2			기술보증대출(2억)		기술보증기금

10. 사업화 현황

(단위 : 명, 년)

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 년도	기술 수명
							국내	국외		
1	자기실시	매출	국내	소재제품	고순도 EGCG	아모레퍼시픽외 1	92백만		2017	
2	자기실시	매출	국내	소재제품	고순도 EGCG	바이오제닉스외 1	175백만		2018	
3	자기실시	매출	국내	소재제품	고순도 EGCG	하이사이언스외 3	365백만		2019	
합계							632백만			

제2절 연구개발 성과 활용 계획

1. 본 EGCG 고함유 녹차소재를 기반으로 하여 다이어트 건강기능식품의 제품화 방향을 설정하고 여기에 시중의 다른 경쟁 소재와 차별화하기 위하여 비만억제 기능에 피부건강개선의 복합 기능을 갖는 제품화를 목표로 하였다. 과제 수행 기간 중에 본 소재가 고시형 녹차추출물로 인정됨에 따라 완제품의 조기 런칭이 가능해 졌지만 피부주름억제 인체적용시험에서 유의적 평가가 도출되지 못하여 섭취량을 높여 추가로 진행하고 있는 임상시험 결과가 나오기까지 출시가 지연되고 있다. 그 결과에 따라 개별인정에서 <기능성추가> 인정을 받아 비만억제 기능에 피부주름억제 복합 기능의 건기식 제품을 상용화하는데 활용하게 될 것이다.
3. 본 소재를 활용한 원료제품, 건기식제품(캡슐), 커피 맞춤형 기능성첨가제(스틱)의 3개 품목이 출시될 예정으로 본 연구개발 성과로 향후 매출 증대에 크게 기여할 것이다.
4. 또한 본 연구개발을 통해 도출될 추가 결과물들은 논문, 특허, 학술발표 등 형식으로 발표되어 관련산업의 발전에 기여할 것이다.

제 6 장 연구개발과정 수집한 해외과학기술정보

-해당사항없음-

제 7 장 연구시설·장비 현황

-해당사항 없음-

제 8 장 참고문헌

1. Cheon, S. I., Eun Ji Heo, E. J., Yoon, M. J., Choi, S. U., Ryu, G-S. and Ryu, S. Y. (2018) Evaluation for Long-term Stability of EGCG Rich Green Tea Extract (EGTE). *Kor. J. Pharmacogn.* **49**(4) : 328-335.
2. Ikeda, I., Kobayashi, M., Hamada, T., Tsuda, K., Goto, H., Imaizumi, K., Nozawa, A., Sugimoto, A. and Kakuda, T. (2003). Heat-Epimerized Tea Catechins Rich in Gallicocatechin Gallate and Catechin Gallate are more Effective to Inhibit Cholesterol Absorption than Tea Catechins Rich in Epigallocatechin Gallate and Epicatechin Gallate. *J. Agri. Food Chem.* **51** (25): 7303-7307.
3. Sur, S. and Panda, C. K.(2017) Molecular aspects of cancer chemopreventive and therapeutic efficacies of tea and tea polyphenols. *Nutrition* 43-44: 8-15.
4. Kang, K. W., Oh, S. J., Ryu, S. Y., Song, G. Y., Kim, B. H., Kang, J. S. and Kim, S. K. (2010) Evaluation of the total oxy-radical scavenging capacity of catechins isolated from green tea. *Food Chemistry* **121**: 1089-1094.
5. Peter, B., Bosze, S. and Horvath, R. (2017) Biophysical characteristics of proteins and living cells exposed to the green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCg): review of recent advances from molecular mechanisms to nanomedicine and clinical trials. *Eur Biophys J.* **46**(1) : 1-24.
6. Chakrawarti, L., Agrawal, R., Dang S., Gupta, S. and Gabrani, R. (2016) Therapeutic effects of EGCG: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* **26**(8): 907-16.
7. Chen, I. J., Liu, C. Y., Chiu, J. P. and Hsu, C. H. (2016) Therapeutic effect of high-dose green tea extract on weight reduction: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clin. Nutr.* **35**: 592-529.
8. Chiaverini, C., Roger, C., Fontas, E., Bourrat, E., Bourdon-Lanoy, E., Labrèze, C., Mazereeuw, J., Vabres, P., Bodemer, C. and Lacour, JP. (2016) Oral epigallocatechin-3-gallate for treatment of dystrophic epidermolysis bullosa: a multicentre, randomized, crossover, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Orphanet J Rare Dis.* **25**; 11-31.
9. Chen, J., Li, Y., Zhu, QI, Li T., Lu, H., Wei, N., Huang, Y., Shi, R., Ma, X., Wang, X. and Sheng, J. (2017) Anti-skin-aging effect of epigallocatechin gallate by regulating epidermal growth factor receptor

- pathway on aging mouse model induced by d-Galactose. *Mech Ageing Dev.* **164**: 1-7.
10. Lin, S. Y., Kang, L., Wang, C. Z., Huang, H. H., Cheng, T. L., Huang, H. T., Lee, M. J., Lin, Y. S., Ho, M. L., Wang, G. J. and Chen, C. H. (2018) (-)-Epigallocatechin-3-Gallate (EGCG) Enhances Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Molecules* **23(12)**: E3221.
11. Kim, E., Hwang, K., Lee, J., Han, S. Y., Kim, E. M., Park, J. and Cho, J. Y. (2018) Skin Protective Effect of Epigallocatechin Gallate. *Int J Mol Sci.* **19(1)**: E173.
12. Alison, F., Stallings, and Mary, P. Lupo. (2009) Practical Uses of Botanicals in Skin Care. *J. Clin Aesthet Dermatol.* **2**: 36-40.
13. Hajiaghaalipour, F., Kanthimathi, M. S., Abdulla, M. A. and Sanusi, J. (2013) The Effect of *Camellia sinensis* on Wound Healing Potential in an Animal Model. *Evid Based Complement Alternat Med.* **2013**: 386734.
14. Guo, Y. L., Zhao, Y., Nan, Y., Wang, X., Chen, Y. and Wang, S. (2017) (-)-Epigallocatechin-3-gallate ameliorates memory impairment and rescues the abnormal synaptic protein levels in the frontal cortex and hippocampus in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroreport.* **28**: 590-597
15. Ryu, S. Y. and Choi, S. U. Mass-production of highly pure Epicatechin gallate KR 대한민국특허 10-1659423 (2016)
16. Zhu, H., Kim, J. S., Park, K. L., Cho, C. W., Kim, Y. S., Kim, J. W., Ryu, S. Y. and Kang, J. S. (2009) Estimation of Harvest Period and Cultivated Region of Commercial Green Tea by Pattern Recognition. *Yakhak Hoeji* **53**: 51-59.
17. Lee SJ. Novel natural products as active material for beauty food. *Food Sci.* **40**: 10-18 (2008)
18. Chung JH. Photoaging in Asians. *Photodermatol. Photo.* **19**: 109-121 (2003)
19. Oh JH, Kim A, Park JM, Kim SH, Chung AS. Ultraviolet B-induced matrix metalloproteinase-1 and -3 secretion are mediated via PTEN/Akt pathway in human dermal fibroblasts. *J Cell Physiol* **209**: 775-785 (2006)
18. Soter NA. Acute effects of ultraviolet radiation on the skin. *Semin. Dermatol.* **9**: 11-15 (1990)
19. Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol

- (-)-Epigallocatechin-3-gallate. *Cancer. Res.* 66: 2500-2505 (2006)
20. Kang JH, Pack YK, Chung ST, Row KH. Extraction and purification of EGCG from green tea. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 14: 517-522 (1999)
21. Youn HS. Anti-inflammatory Effects of Resveratrol, (-)-Epigallocatechin-3-gallate and Curcumin by the Modulation of Toll like Receptor Signaling Pathways. *Korean J. Food. Sci. technol.* 39: 481-487 (2007)
22. Chen ZP, Schell JB, Ho CT, Chen KY. Green tea epigallocatechin gallate shows a pronounced growth inhibitory effect on cancerous cells but not on their normal counterparts. *Cancer. Lett.* 129: 173-179 (1998)
23. Ha JS, Kim JH. Protective effect of EGCG against reactive oxygen species-induced stress. *International journal of Oral Biology.* 30: 77-84 (2005)
24. Cabrera C, Artacho R, Gimenez R. Beneficial effects of green tea-a review. *Journal of the American College of Nutrition.* 25: 79-99 (2006)
25. Yusuf N, Irby C, Katiyar S, Elmets C. Photoprotective effects of green tea polyphenols. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 23: 48-56 (2007)
26. Rutter K, Sell D, Fraser N, Obrenovich M, Zito M, Starke-Reed P, Monnier VM. Green tea extract suppresses the age-related increase in collagen crosslinking and fluorescent products in C57BL/6 mice. *Int J Vitam Nutr Res.* 73: 453-460 (2003)
27. Steenport M, Khan KM, Du B, Barnhard SE, Dannenberg AJ, Falcone DJ. Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-3 Induce Macrophage MMP-9: Evidence for the Role of TNF- α and Cyclooxygenase-2. *J. Immunol.* 183: 8119-8127 (2009)
28. Kondo S. The roles of cytokines in photoaging. *J. Dermatol. Sci.* 1: 30-36 (2000)
29. Levin J, Maibach H. The correlation between transepidermal water loss and percutaneous absorption: An overview. *J. Control Release* 103: 291-299 (2005)
30. Berardesca E, Maibach HI. Transepidermal water loss and skin surface hydration in the non invasive assessment of stratum corneum function. *Dermatos. Ber. Umwelt.* 38: 50-53 (1990)

31. Imokawa G, Takema Y, Yorimoto Y, Tsukahara K, Kawai M, Imayama S. Degree of ultraviolet-induced tortuosity of elastic fibers in rat skin is age dependent. *J. Invest Dermatol* 105: 254-258 (1995)
32. Kim H, Oh I, Park KH, Kim NM, Do JH, Cho Y. Stimulatory effect of dietary red ginseng on epidermal hydration and ceramide level in ultraviolet-irradiated hairless mice. *J. Med. Food* 12: 746-754 (2009)
33. Bak H, Hong SP, Jeong SK, Choi EH, Lee SE, Lee SH, Ahn SK. Altered epidermal lipid layers induced by long-term exposure to suberythemal-dose ultraviolet. *Int. J. Dermatol* 50: 832-837 (2001)
34. Boelsma E, Hendriks HF, Roza L. Nutritional skin care: health effects of micronutrients and fatty acids. *Am J Clin Nutr* 73: 853-864 (2001)
35. Seo JY, Cho KH, Eun HC, Chung JH. Skin aging from phenotype to mechanism. *Korean. J. Invest. Dermatol* 8: 187-194 (2001)

< 뒷 표지 >

주 의

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