보안 과제( ), 일반 과제(O) / 공개( ), 비공개(O), 발간등록번호(O)
고부가가치식품기술개발사업 2019년도 최종보고서

발 간 등 록 번 호
11-1543000-003089-01

녹차 유래 고순도 EGCG 소재 기반의 항노화 건강기능식품 개발 및 상용화 최종보고서

2020.06.05.

주관연구기관/㈜알앤오식품
협동연구기관/한국화학연구원
대전대산협단

농 림 축 산 식 품 부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “녹차 유래 고순도 EGCG 소재 기반의 항노화 건강기능식품 개발 및 상용화”(개발기간 : 2017. 06. 15 ~ 2019. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 06. 05.

주관연구기관명 : ㈜알앤오식품 (류건식) (인)
협동연구기관명 : 한국화학연구원 (이미혜) (인)
참여기관명 : 대전대산학협력단 (황석연) (인)

주관연구책임자 : 류 건 식
협동연구책임자 : 유 시 용
최 정 준

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

<table>
<tr><td>과제고유번호</td><td>317034-03</td><td>해당단계 연구기간</td><td>2017.06.15 ~2019.12.31</td><td>단 계 구 분</td><td>총 단 계</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 사 업 명</td><td>단 위 사 업</td><td colspan="4">농식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td>사 업 명</td><td colspan="4">고부가가치식품기술개발사업</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 과 제 명</td><td>대 과 제 명</td><td colspan="4">(해당 없음)</td></tr>
<tr><td>세부 과제명</td><td colspan="4">녹차 유래 고순도 EGCG 소재 기반의 항노화 건강기능식품 개발 및 상용화</td></tr>
<tr><td rowspan="2">연 구 책 임 자</td><td rowspan="2">류 건 식</td><td>해당단계 참여 연구원 수</td><td>총: 명
내부: 명
외부: 명</td><td>해당단계 연구개발비</td><td>정부: 천원
민간: 천원
계: 천원</td></tr>
<tr><td>총 연구간 참여 연구원 수</td><td>총:18명
내부:17명
외부: 1명</td><td>총 연구 개발비</td><td>정부:1,160,000천
민간:386,667천
원계:1,546,667천원</td></tr>
<tr><td>연구기관명 및 소 속 부 서 명</td><td colspan="3">㈜알앤오식품 기업부설연구소</td><td colspan="2">참여기업명</td></tr>
<tr><td>국제공동연구</td><td colspan="3">상대국명:</td><td colspan="2">상대국 연구기관명:</td></tr>
<tr><td>협 력 연 구</td><td colspan="3">연구기관명:
한국화학연구원
대전대산학협력단</td><td colspan="2">연구책임자:
유 시 용
최 정 준</td></tr>
</table>

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 갈음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서원문	연구시설·장비	기술요약정보	소프트웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명정보	생물자원	정보	실물
등록·기탁번호	The Am.J.Chin.Med. 48(3) 1-15 한국생약학회지 49(4) 328-335 한국생약학회지 50(3) 198-204 한국작물학회지 8(2019) 202-208	10-2019-0113722 10-2019-0121437 10-2019-0107930									

국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

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

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

<요약문>

연구의 목적 및 내용	기존 녹차 소재의 비호감을 개량하여 비만억제 뿐만 아니라 항노화 복합 기능을 갖는 새로운 식품소재로 개발하여 기존 제품들과 차별화함으로써 제품 매출과 국민건강 증진에 기여할 필요가 있음. EGCG 고함유 녹차추출물 제조 특허기술에 대한 공정을 개선하여 대량 생산화하고 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 항산화, 항당뇨, 인지기능개선 등의 작용기전 및 전임상연구, 인체적용시험 등을 수행하여 그 유효성을 평가하였음.
연구개발성과	탈카페인, EGCG 고함유 녹차추출물 기반의 항노화 기능의 건기식 소재화 및 제품화의 완성도를 높였으며 본 소재의 작용기전 연구에서 입증된 인지기능개선 기능이 임상시험에서는 안전성은 인정된 반면, 유의적 유효성 결과는 보여주지 못하였음(다른 통계법을 적용한 2차 추가분석이 진행 중임).
연구개발성과의 활용계획 (기대효과)	본 EGCG 고함유 녹차소재를 기반으로 하여 다이어트 건강기능식품의 제품화 방향을 설정하고 여기에 시중의 다른 경쟁 소재와 차별화하기 위하여 인지기능개선의 복합 기능을 갖는 제품화를 목표로 하였음. 과제 수행 기간 중에 본 소재가 고시형 녹차추출물로 인정됨에 따라 완제품의 조기 런칭이 가능해 졌지만 인지기능개선 인체적용시험에서 유의적 평가가 도출되지 못하여 2차 분석이 진행중이며 섭취량을 높인 추가 임상시험을 계획 중임. 그 결과에 따라 개별인정에서 <기능성추가> 인정을 받아 인지기능개선 건기식 제품을 상용화하는데 활용하게 될 것임. 본 소재를 활용한 원료제품, 건기식제품(캡슐), 커피 맞춤형 기능성첨가제(스틱)의 3개 품목이 출시될 예정으로 본 연구개발 성과로 향후 매출증대에 크게 기여할 것임. 또한 본 연구개발을 통해 도출될 추가 결과물들은 논문, 특허, 학술발표 등 형식으로 발표되어 관련산업의 발전에 기여할 것임.

국문핵심어 (5개 이내)	녹차(EGCG)	항산화	항당뇨	인지기능개선	건강기능식품
영문핵심어 (5개 이내)	EGCG	antioxidant	antidiabetic	increasing cognitive ability	Functional health food

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

SUMMARY

Green tea, least processed and non-fermented leaves of the plant *Camellia sinensis*, can be considered as a functional food because of its proven properties, it is anti-obesic, anti-oxidant and cardio-protective etc. The health benefits of green tea are mainly due to the presence of high levels of the bioactive flavanol catechins, especially epigallocatechin-3-gallate (EGCG).

Decaffeined and EGCG-rich green tea extracts (EGTE) which were standardized and specialized, were developed for anti-oxidant, anti-diabetic, and cognitive-improvement functional food ingredients. The EGTE treatment significantly improved cognitive impairment in Y-maze test, passive avoidance test, and Morris water maze test etc. But the EGTE was not evaluated significantly in 12-weeks, doubled, randomized, placebo controlled study on alleviating cognitive ability in human.

목 차

CONTENTS

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제1절 연구개발의 배경 및 필요성

1. 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 고성장 하고 있는 현실이다.

2. 녹차는 역사 이래 오래전부터 '살빠지는 약' 지방분해제로서 뿐만 아니라 항산화, 항당뇨, 기억력개선 등 다양한 기능이 여러 문헌을 통해 보고되고 있음에도 불구하고 떫은맛과 카페인 함유 등의 이유로 녹차의 활용도는 그리 크지 않다고 할 수 있다.

3. 21세기 초 유럽, 미국, 일본을 중심으로 이런 녹차의 단점을 개량하려는 시도가 경쟁적으로 시작되면서 관련된 새로운 녹차소재 제품들이 글로벌시장에 등장하고 있다.

4. 따라서 녹차 비호감의 원인인 떫은맛과 카페인을 제거한 새로운 탈카페인, 카테킨 고함유 녹차소재의 개발이 절실하며, 젊은층을 겨냥한 비만 및 피부주름개선 시장뿐만 아니라 중장년층을 겨냥한 항노화 시장을 집중 공략할 필요가 있다.

5. 국내시장에는 34종의 녹차추출물 관련 제품들이 출시되어 있는데 이중 ㈜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. ㈜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 항산화, 항당뇨 및 인지기능개선 기능을 갖는지, 섭취해도 몸에 안전한 것인지 등이 검토 되어야 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

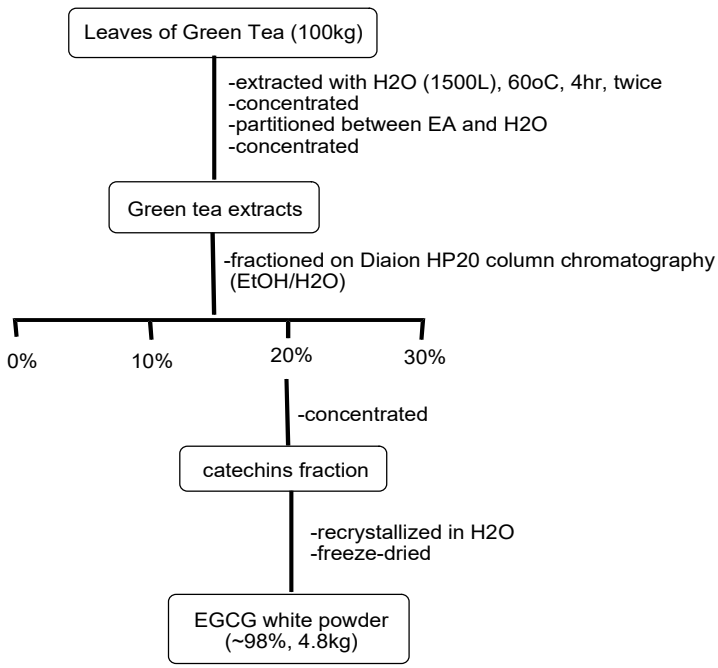
제1절 연구개발 대상기술의 개요

1. 개요

본 특허기술은 녹차 건엽으로부터 4개 공정(추출, 분획, 분배, 재결정)을 거쳐 탈카페인, 고순도 EGCG를 분리정제하는 기술로서, 열수 추출, 크로마토그라피 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)	㈜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 출물로부터(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 라이센스 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 고함유 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 스팩에 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	Silhousette	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).

3. 시장 규모 및 성격

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

나. 해외시장 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.

다. 국내시장 성격

(1) 인구 고령화와 더불어 항노화 산업이 급성장하여 2010년에는 10.9조원, 2011년에는 11.9조원으로 연평균 10.1% 성장하고 있음. 이 중에서도 항산화 개별인정형 건기식 소재는 460억으로 약 20%를 차지하고 있다.

(2) 국내 항산화 기능성 원료는 유니벡스대나무잎추출물(tricin, coumaric acid), 포도종자추출물(Proanthocyanidin), 프랑스해안송껍질추추물(피크노제놀), 복분자주정추출물(ellagic acid), 코엔자임Q, 메론추출물(SOD), 토마토추출물(lycopene), 비즈왁스알콜(1-tetraacotanol), 홍삼 등이 등록되어 있다.

(3) 당뇨병 유병율(만30세 이상, 표준화)은 2001년 8.1%에서 최근 10년간 약 9% 수준을 유지하다가 2013년 11.0%로 증가하였다. 동기간 남자는 9.5%에서 약11%를 유지하다가 12.8%로 1.8% 증가하였고, 여자는 약 8%를 유지하다가 9.1%로 1.1% 증가하였다.

(4) 당뇨환자에게 권하는 식이요법은 정상적인 체중 유지, 정상적인 혈당과 혈중 지질 농도 유지, 인슐린과 혈당강하제 사용에 부합하는 규칙적인 식사, 모든 영양소를 골고루 섭취하는 균형적 식사, 합병증 예방 위한 식사가 요구된다.

(5) 국내 혈당조절 기능성 원료는 구아바잎추출물, 난소화성말토덱스트린, 동결건조누에분말, 마주정추출물, 바나바추추물, 솔잎증류농축액, 알부민, 인삼가수분해농축액, 지각상엽추출물, 쥐눈이콩펩타이드복합물, 콩발효추출물, 피니톨, 홍경천등복합추출물, 노파추추루물, 이룰린/치커리추출물 등이 등록되어 있다.

(6) 인지능력개선은 뇌의 신경전달물질을 조절하여 저하된 인지능력을 개선하려는 것으로 뇌의 신경세포나 뇌기능에 필요한 물질의 구성성분

으로 뇌기능을 유지하는데 도움을 준다. 녹차추출물이 인지능력을 개선한다는 주장이 있으나 테아닌에 의한 것인지 EGCG에 의한 것인지는 분명치 않다.

(7) 국내 인지능력개선 기능성원료로는 참당귀뿌리추출물, 도라지추출물, 포스파티딜세린 *Lactobacillus Heveticus* 발효물 등이 등록되어 있다.

(8) 미국 및 캐나다에서 일부 제기하고 있는 녹차추출물의 부작용에 대해 국내에서도 식약처 고시형 원료로서의 재검토가 필요한 상황에서 주성분 EGCG를 기준으로 한 1일 섭취량(dosage)이 재설정되어 2019년 9월에 고시되었다(EGCG로서 300~330mg/일에서 300mg/일로 변경됨)

(9) 항산화 개별인정형 건기식 소재

소재명	주성분	비고
유니벡스대나무추출물	coumaric acid	
포도종자추출물	proanthocyanidin	
프랑스해안송껍질추출물	피크노제놀	
복분자주정추출폴리페놀	ellagic acid	
코엔자임Q10	코엔자임Q10	
매론추출물	SOD	
토마토추출물	lycopene	
고농축녹차추출물	EGCG(300-330mg/일)	
비즈왁스알콜	코사놀	
홍삼농축액	Rg1, Rb1	
유비퀴놀	유비퀴놀	

(10) 항당뇨 개별인정형 건기식 소재

소재명	주성분	비고
난소화성말토덱스트린	말토덱스트린	
바나바주정추출물	corosolic acid	
피니톨	피니톨	
구아바추출물	polyphenol	
솔잎증류농축액	carene, limonene	
알부민	albumin	
Nopal추출물	수용성식이섬유	
지각상엽추출혼합물	naringin	
인삼가수분해농축액	Rg1	
히드록시프로필메틸셀루로스	히드록시프로필메틸셀루로스	

(11) 인지기능개선 개별인정형 건기식 소재

소재명	주성분	비고
참당귀뿌리추출물	decursin, decursinol	
포스파티딜세린	포스파티딜세린	
도라지추출물	플라티코딘 D	
L-Helveticus발효물	젖산	
참당귀추출분말	nutragen	

(12) 국내 건기식 중 항당뇨나 인지기능개선 시장은 소비자층이 매우 옅기 때문에 독자 기능성 제품으로 론칭하는 것은 위험성이 있음. 반면 항산화 시장은 건기식 시장의 20%를 점유할 만큼 큰 시장을 형성하고 있기는 하지만 항산화 기능이 없는 소재는 없다 할 만큼 경쟁력 확보가 쉽지 않은 단점이 있음.

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 건조시킨후 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 함량 분석 및 품질관리를 위한 적합한 HPLC 분석법을 개발하고 분석법을 validation 하고자 한다.

카페인을 포함하여 EG, EGC, EGCG, ECG 등 주요 녹차 catechin 성분의 정량 분석을 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 성상: 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)

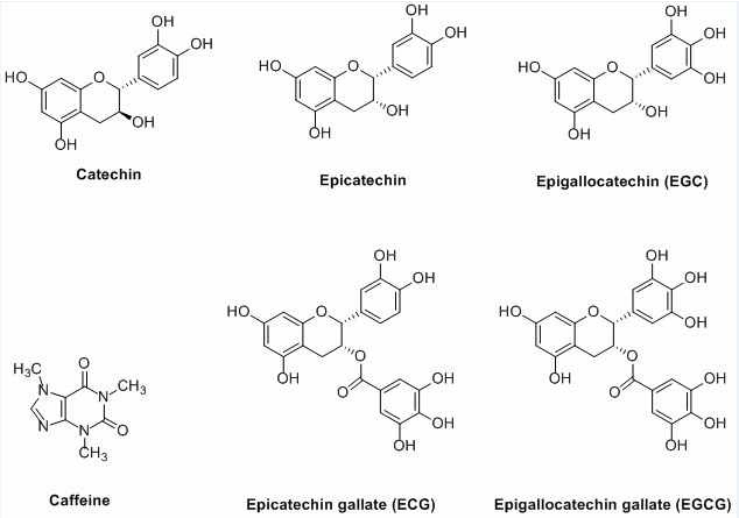
분자식: $C_{22}H_{18}O_{11}$, 분자량: 458.37, CAS No.: 989-51-5

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	Futecs
Microsoft Office Excel	2010	Microsoft co.

다. 시험방법

(1) 이동상의 조제

(가) Solution A : 0.1% Acetic acid in water 1L를 bottle 에 옮기고 aceticacid 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.(μg/mL)
EGCG98, 50ppm	50
EGCG98,100ppm	100
EGCG98,200ppm	200
EGCG98,400ppm	400

(3) HPLC 분석조건:

시료 액은 0.2 ㎛ syringe filter로 여과하여 분석에 사용하였으며 INNO column C18 (4.6x250 mm) 컬럼을 사용하였다. 이동상 A (아세토나이트릴) 와 B (물 in 0.1 % 아세틱 에시드)를 1.0 ml/min 의 흐름 속도로 기울기 용매 조건으로 용 출시켜 분석하였다. 시료 주입량은 100 ㎕이며, Oven 온도는 35 ℃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	20μl

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 피크 면적비를 검량선 계산식(y=ax±b)에 대입하여 산출하였다.

조제물의 농도 = 측정농도 X 희석배율

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^2의 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 RSD 값이 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 ± 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 시그날 대 노이즈 比 (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 분석법으로 는 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 품질평가시험법 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 기울기용리방식(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, ECG 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 품질평

가를 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)

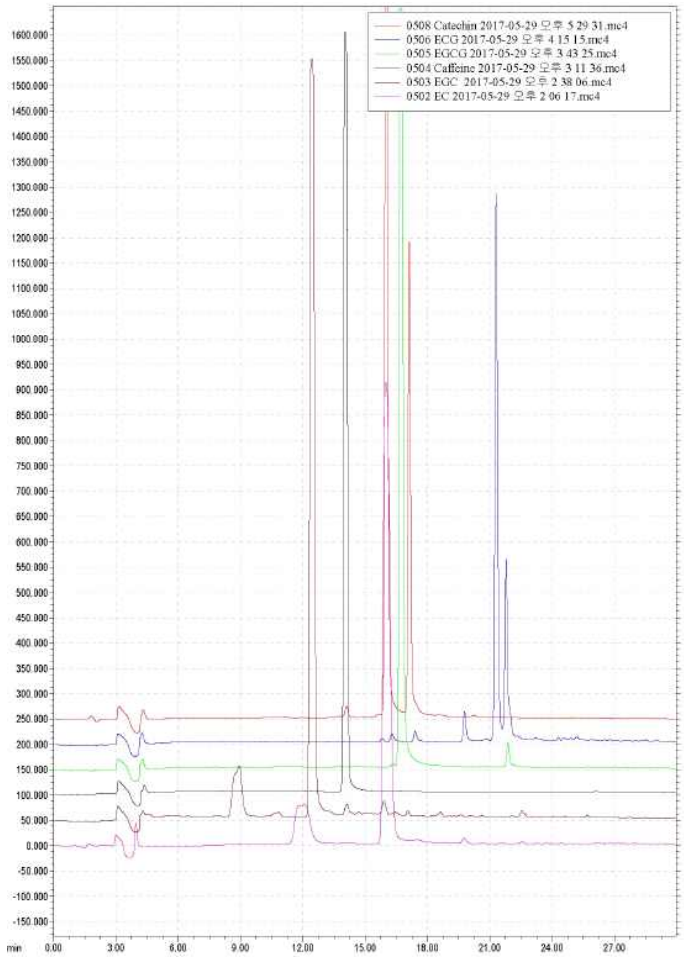


Fig 1. HPLC chromatogram of major components in green-tea

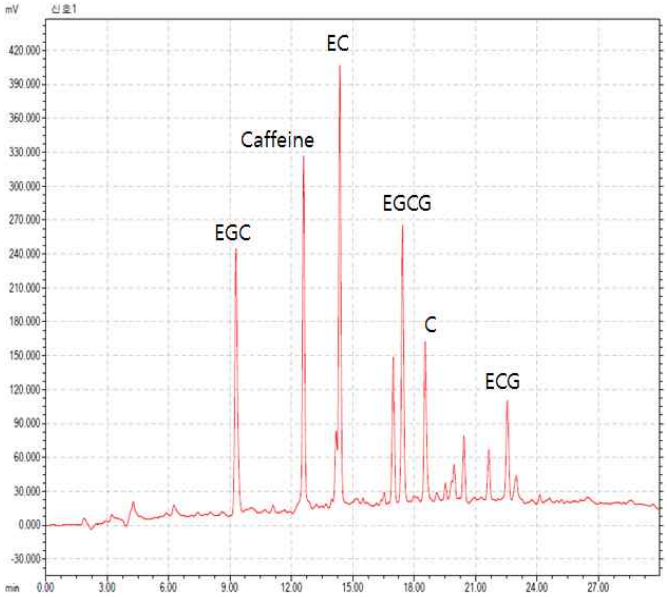


Fig 2. HPLC Chromatogram of whole green-tea extract

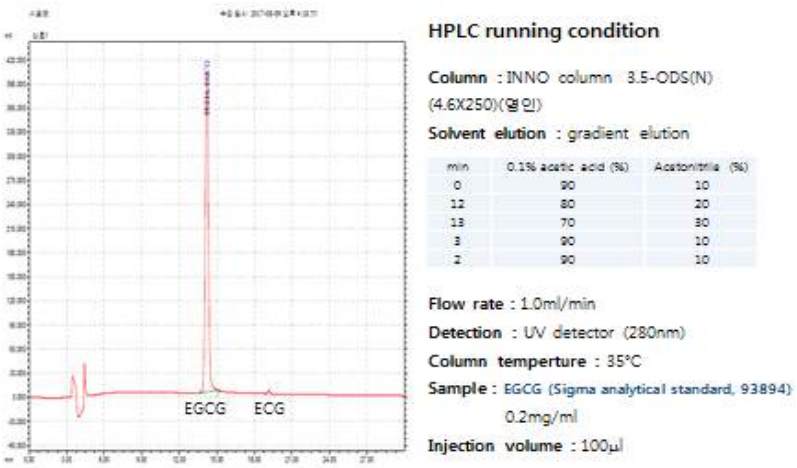


Fig 3. HPLC Chromatogram of standard EGCG (analytical grade, Sigma)

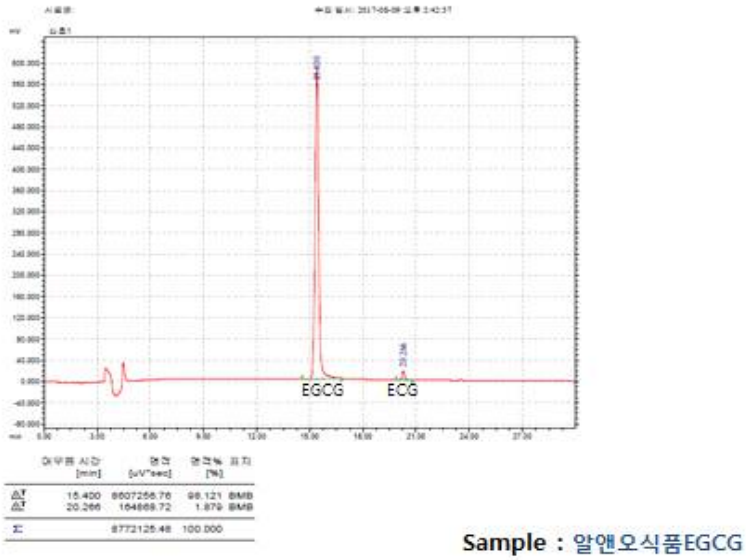


Fig 4. HPLC Chromatogram of EGCG고함유 녹차추출물(EGTE)

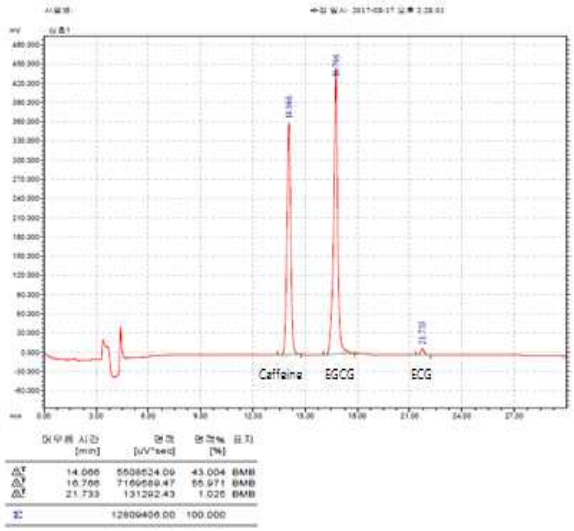


Fig 5. HPLC Chromatogram of [EGCG고함유 녹차추출물 (EGTE) + caffeine]

(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 간섭피크가 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 나타냄을 알 수 있었다. (Fig 6)

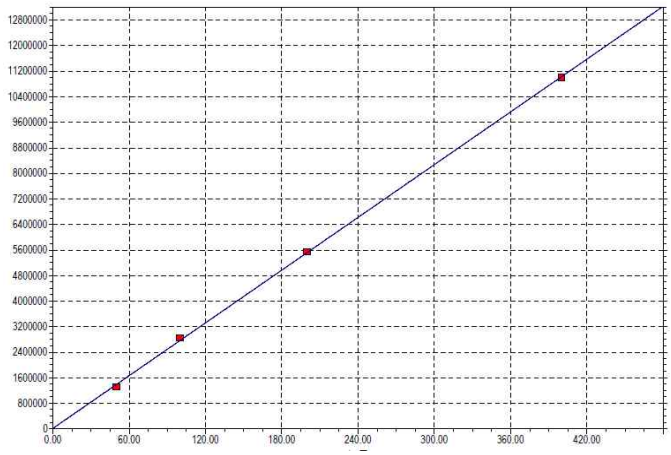


Fig 6. Calibration curve of EGCG

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 area의 평균값 및 상대표준편차(RSD) 값을 구하였다.

0.4 % 수용액의 경우 retention time은 14.1 min ± 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 min ± 0.15, 14.1 min ± 0.15 및 14.1 min ± 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 ± 219.82으로 관찰되었으며 상대표준편차는 각각 1.30, 3.95 및 1.87 으로 산출되어 우수한 일내정밀성을 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 precisiion)

EGCG고함유 녹차추출물' (EGTE) 시료를 각각 0.05 %, 0.1 %, 0.2%, 0.4 %을 조제한 후, 1일 간격으로 3회 반복측정하고 retention time 및 peak area의 평균값 및 상대표준편차(RSD) 값을 구하였다. 0.4 % 수용액의 경우 retention time은 14.4 min ± 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 min ± 0.45, 14.40 min ± 0.26 및 14.17 min ± 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 ± 515.29으로 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 ± 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 시그날 대 노이즈 比 (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 품질평가시험법 및 표준화 공정에 활용할 수 있는 새로운 HPLC 분석법를 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 등[18]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 최소검출한계(LOD) 등을 재검토함으로써 분석방법의 타당성 및 시스템 적합성를 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 등[18] 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 적합성를 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 피크면 적값(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 일간 정밀성을 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 ± 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, 표준편

차는 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 ppm 의 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 충분 히 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

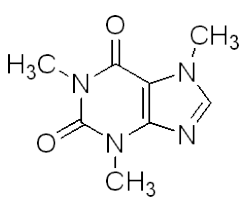
(다) 분석장비의 준비

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℃
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(μg/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 가스크로마토그래프 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

가스크로마토그래프/불꽃이온화검출기 혹은 질량분석기

헤드스페이스샘플러 (HeadSpaceSampler)

Wax 칼럼 (0.25 mm i.d. × 30m × 0.25 µm film thickness), FFAP 칼럼 (0.25 mm i.d. × 30m × 0.25 µm film thickness) 혹은 이와 동등한 것

(다) 분석장비의 준비

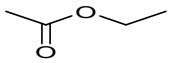
가스크로마토그래프는 가스를 0.5 mL/min.으로 충분한 시간동안 흘려, 검출기 및 칼럼을 안정화시킨다.

(3) 표준물질 및 일반시약

(가) 표준물질

초산에틸[Ethyl acetate (EA)]

분자식 : $CH_3COOC_2H_5$, 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 µg/mL 표준용액으로 사용한다.

상기용액은 휘발성이 있으므로 휘발성을 최소화한 바이알에 넣는다.

(나) 검량선 작성용액의 조제

균질화 한 공시험용 시료 5 g을 정밀히 취한다.

위의 시료를 25 mL 헤드스페이스샘플러용 유리병에 넣는다.
여기에 가스타이트 시린지를 이용하여 표준원액 1250, 2500, 5000 ppm인 표준용액 100 μL를 각각 넣은 후 다음의 시험조작에서 검량선 작성용액으로 사용한다. 이 용액은 각각 5, 10, 20 μg/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. × 30 m × 0.25 ㎛)
	칼럼온도	초기조건 : 40℃에서 5분 정체 승온 1단계 1) : 3℃/분으로 50℃ 후 5분 정체 승온 2단계 2) : 50℃/분으로 150℃ 후 3분 정체
	캐리어가스 및 유량	질소 또는 헬륨, 0.5 mL/분
	분할비율	40 : 1
헤드스페이스 샘플러	주입량	100 ㎕
	주입기 온도	120℃
	가열 온도 및 방법	80℃, 흔들면서 가열
	가열 시간	10분
	검출기 온도	250℃
	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 주입함으로서 용매들의 검출기 반응을 측정하여 각 성분에 대한 면적을 구하고 검량선을 작성하여 시료 중 초산에틸의 잔류량을 구한다.

(다) 계산

초산에틸 (μg/g) = A x (B/C) x D

A : 시험용액 중 초산에칠 농도(μg/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 칼피셔법에 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	
테트라싸이클린 클로르테트라싸이클린		제9. 일반시험법 5.3.49 옥시테트라싸이클린, 클로르테트라 싸이클린, 테트라싸이클린, 독시싸이클린	
총 아플라톡신		제9. 일반시험법 6.1.1 아플라톡신(B_1, B_2, G_1 및 G_2)	
포도당당량(D.E.)		제5. 식품별 기준 및 규격 6. 포도당 6) 시험방법 (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)	건강기능식품의 기준 및 규격 (건강기능식품공전)	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℃에서 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℃에서 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℃에서 24±2시간 배양 후 전형적인 집락이 발생되면 확정시험 양성으로 한다. BGLB배지에서 35~37℃로 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℃에서 24±2시간 동안 배양한다. 보통한천배지의 집락에 대하여 그람 음성, 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 배

지를 넣은 발효관을 사용한다.

시험용액을 넣은 BGLB 배지(배지 3)을 35～37℃에서 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℃로 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℃에서 24±2 시간 배양한 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 mL 중 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 1mL 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℃에서 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℃에서 24±2시간 배양한다. 대장균군 건조필름배지 I 에서는 붉은 집락 중 주위에 기포를 형성한 집락수를 계산하고, 대장균군 건조필름배지 II 에서는 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), 발효유류, 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 4 ml씩 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 EGCG98 함량변화를 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 4ml씩 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 방치하였다. 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 방치하였다. 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치후 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 방치하였다. 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 4주 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

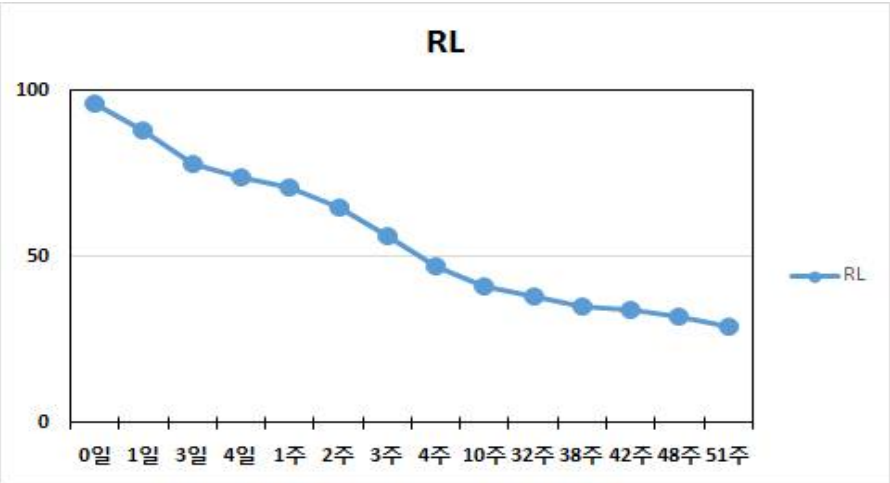


Fig 7. Change of EGCG content in ‘EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) solution stored in transparent vessel at room temperature

(2) 실온-갈색용기 (RD)

갈색용기에 분주한 ‘EGCG고함유 녹차추출물’ (EGTE) 수용액을 실온에 방치하였다. 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 색 변화도 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

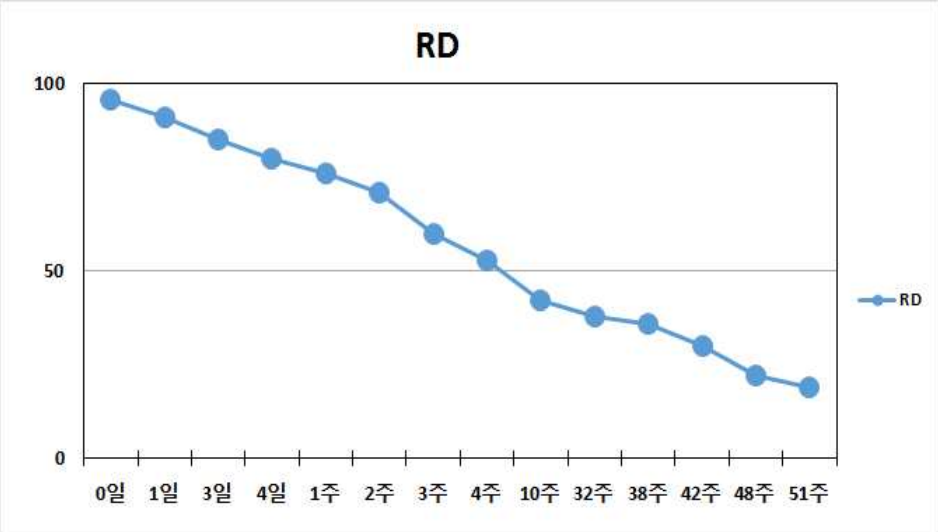


Fig 8. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) solution stored in brown colored vessel at room temperature

(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 acid 첨가해 보관한 실험군(VRL)의 경우, 실험 1일차부터 4일차까지 점진적으로 EGCG 함량이 감소하였으며 4일차에는 실험개시일에 관찰된 EGCG함량의 82 % 수준으로 떨어졌지만 ascorbic acid를 첨가하지 않은 실험군의 EGCG 함량의 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 판별할 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

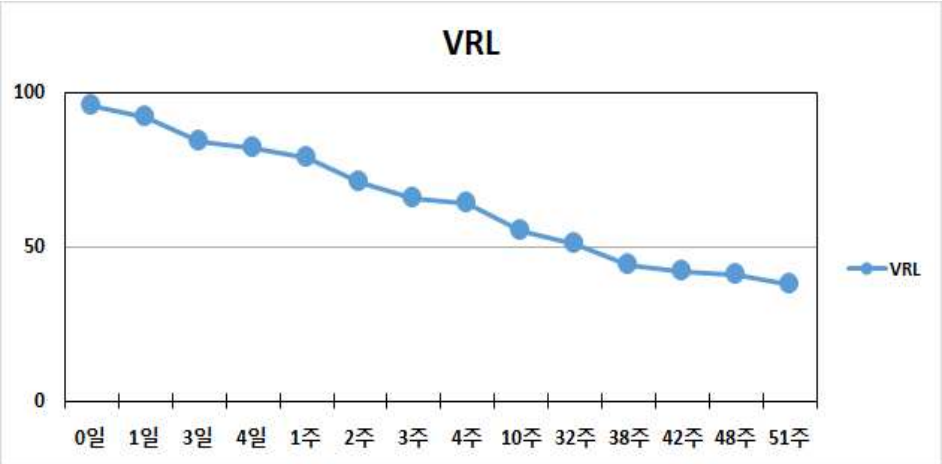


Fig 9. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) solution with ascorbic acid stored in transparent vessel at room temperature

(4) 실온-갈색용기 ascorbic acid 첨가(VRD)

'EGCG고함유 녹차추출물' 에 ascorbic acid를 2:1비율로 첨가한 후 물에 녹인 수용액을 갈색용기에 분주하여 실온에 방치 하였다. 이들을각각 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, 실험종료시점(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

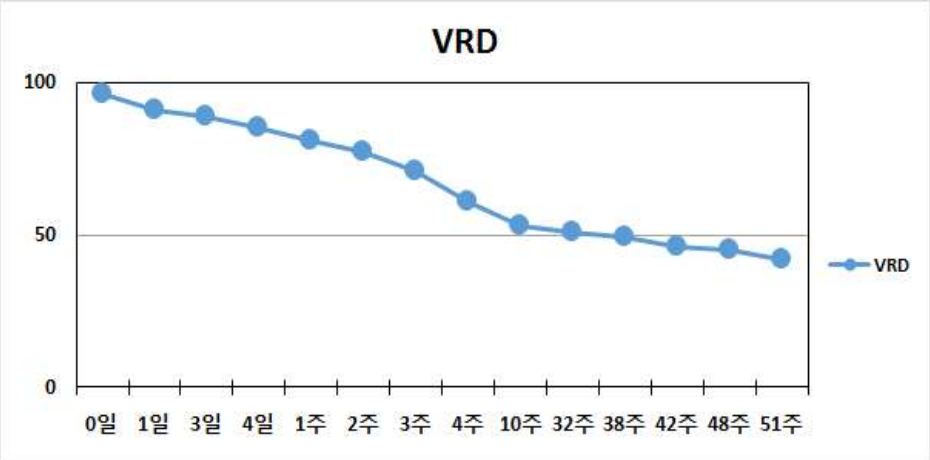


Fig 10. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) solution with ascorbic acid stored in brown colored vessel at room temperature.

(5) 냉장-갈색용기(CD)

갈색용기에 분주한 'EGCG고함유 녹차추출물' 수용액을 냉장고에 방치하였다. 이들을 각각 0일, 1일, 3일, 4일, 1주, 2주, 3주, 4주, 10주, 32주, 38주, 42주, 48주 및 51주 방치 후 EGCG의 함량을 HPLC 방법으로 측정하였다.

EGCG의 함량은 peak area 값을 기준으로 산출하였다. 냉장고 속에서 갈색용기 내에 보관한 실험군(CD)의 경우, 실험 4주차까지도 EGCG의 함량이 85%까지 유지되었으며, 이후 점진적으로 EGCG 함량이 감소하였으나 51주 차에도 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

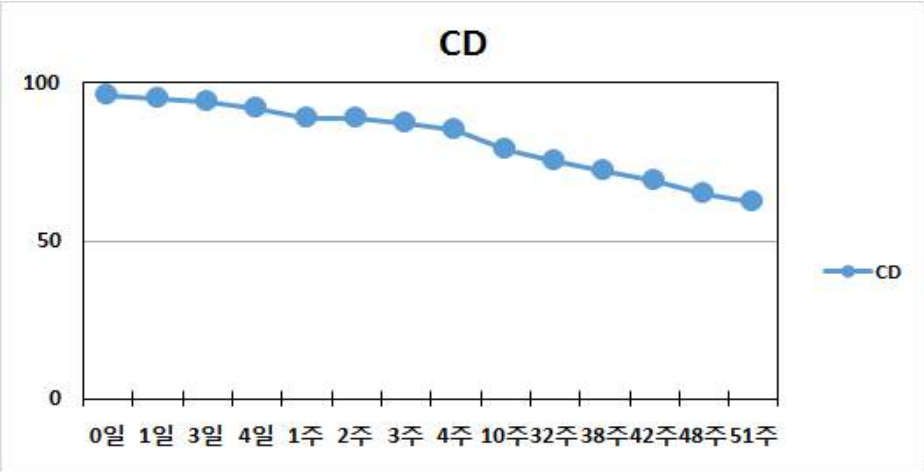


Fig 11. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) solution stored in brown colored vessel at 2℃.

(6) 냉장-갈색용기-ascorbic acid 첨가(VCD)

EGCG고함유 녹차추출물에 ascorbic acid를 2:1비율로 첨가한 후 물에 녹인 수용액을 갈색용기에 분주하여 냉장고에 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. ascorbic acid첨가한 검체를 냉장고 속에서 보관한 실험군(VCD)의 경우, 실험 4주 차까지도 EGCG의 함량이 71%까지 유지되었으며, 이후 점진적으로 EGCG 함량이 감소하였으나 51 주차에도 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

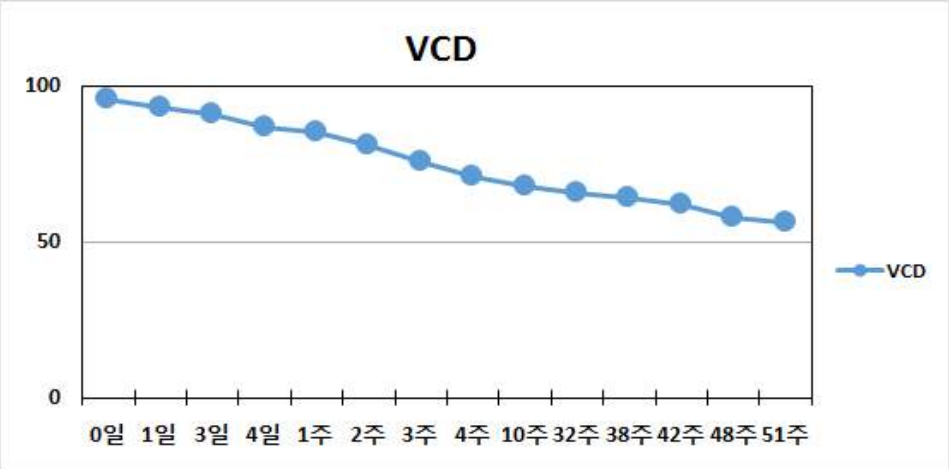


Fig 12. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) with ascorbic acid stored in brown colored vessel at at 2℃.

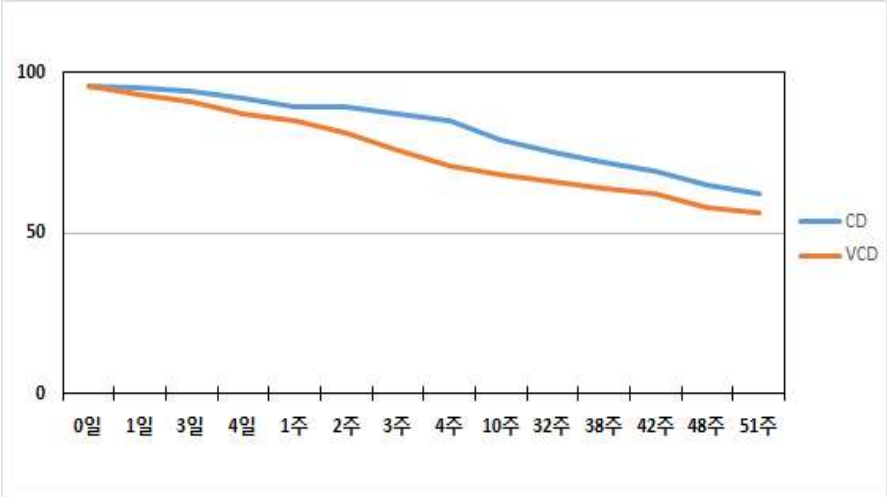


Fig 13. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물 (EGTE) with ascorbic acid and without ascorbic acid stored in brown colored vessel at 2℃.

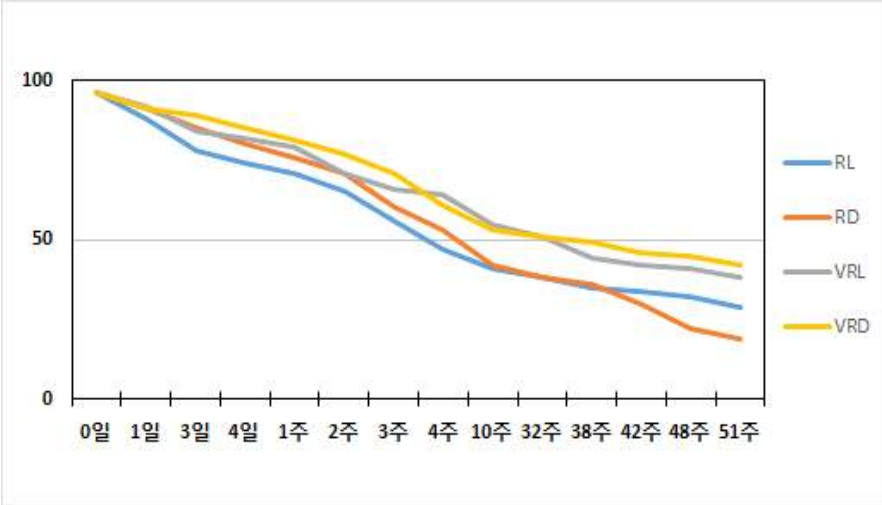
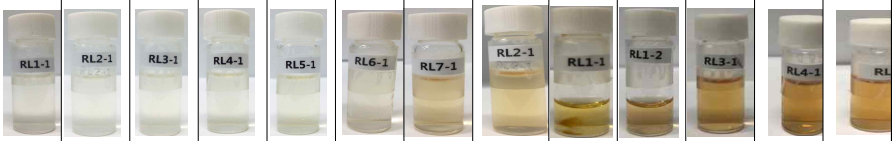
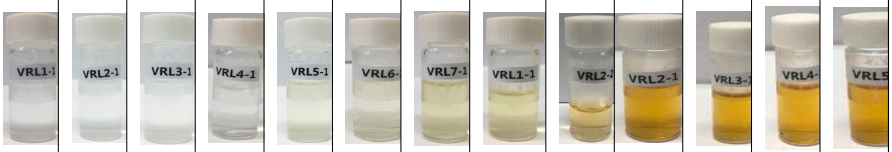


Fig 14. Change of EGCG content in EGCG고함유 녹차추출물 (EGTE) in various storage condition at room temperature.

	기간												
경과일	1일	3일	4일	7일	2주	3주	4주	10주	32주	38주	42주	48주	51주
분석일자	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℃)-Light 4mg/4mL													
②-1 상온(20~22℃)-Dark 4mg/4mL													
③-1 상온(20~22℃)-Light Vta.c+EGCG 4mg/4mL													
④-1 상온(20~22℃)-Dark Vta.c+EGCG 4mg/4mL													

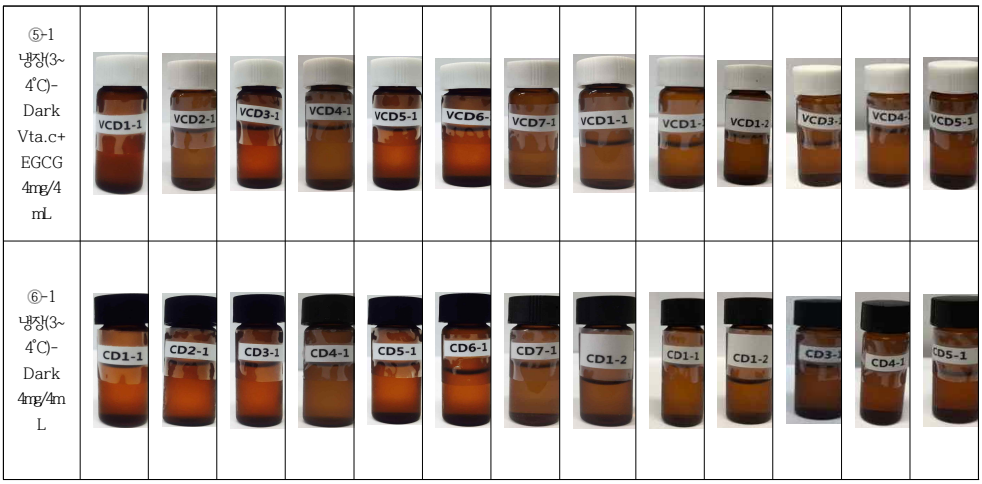


Fig 15. EGCG고함유 녹차추출물(EGTE) 수용액의 온도별, 빛/어둠별 보관상 농도별 색도변화 평가(51주)

라. 결론

추출 및 가공공정 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 조사, 분석하였다.

우선 투명용기 및 갈색용기에 담은 후 각각 실온, 냉장 및 냉동조건에서 보관한 분말상 시료의 경우 HPLC 분석법에 따라 각 해당실험일에 EGCG의 함량을 측정한 결과 실험개시 1년이 경과한 시점에서도 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% 미만정도만 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 냉장보관시에는 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

제 D2019120784 호
문서확인 7Q5M-2R9F-8X9S

시험·검사성적서

제품명		CGTE(원료제품)	제조일자 (유통기한)	2019-11-20
의뢰인	업체명	(주)알엘오식품	성 명	임근석
	주 소	전라북도 전주시 덕진구 월평동길 111-18, 101호 (장동, 전북생물산업진흥원 바이오식품산업화센터)		
제조번호			접수년월일	2019-12-09
검사의뢰목적		참고용	접수번호	D2019120784

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.

시험 · 검사 완료일 : 2019-12-19
시험 · 검사 책임자 : 이현영 ,장정순
검사관련 총 책임자 : 김천화

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
대장균군	음성	엄희숙
초산에틸 잔류용매(mg/kg)	불검출	김진희

분석법-[카테킨-카페인]-건강기능식품공전/녹차추출물
분석법[-초산에틸]-건강기능식품공전

※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.
※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.
※ 본 성적서는 참고용 성적서 입니다. 시험 · 검사결과는 시험 · 검사목적 이외의 광고 및 홍보 등에 이용할 수 없으며, 자가품질검사 또는 정부기관 외 제출 용도로 사용할 수 없습니다.

2019 년 12 월 19 일

한 국 기 능 식 품 연 구 원 장

(사)한국건강기능식품협회 부설 한국기능식품연구원 http://www.khsi.re.kr 전화번호 031[illegible]-1)

KHSI

제3절 EGCG 고함유 녹차소재의 제조공정 최적화

1. 연구 목적

고순도 EGCG 소재를 양산하기 위한 공정 최적화를 모색하여 공정단계 별 산수율을 제고하며 제조원가를 절감할 수 있는 방법을 제시코자 한다.

2. 실험방법 및 결과

가. 실험재료

-녹차건엽(보성녹차)
-녹차건엽 100kg
-외관 및 성상: 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 크로마토그라피 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 양산시에는 용매분배 분리능이 현저히 낮아진다.

① Trail 1: 용매 량을 늘림(30 브릭기스 추출물 10L 당 EA용매를 1.0배, 1.5배, 2.0배 비율)로 분배 시도한다.

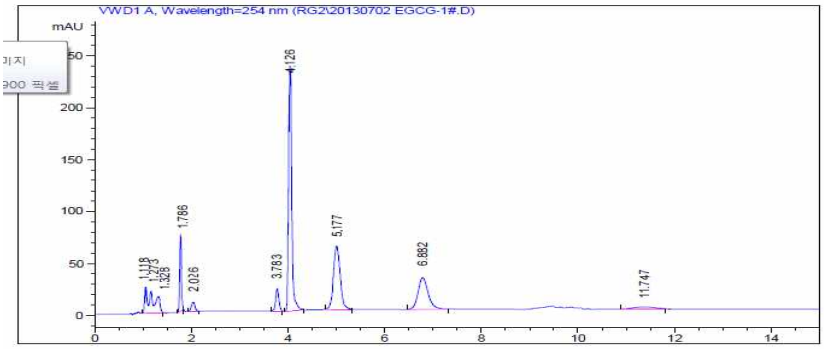
② Trial 2: 30분간 반응기 회전 후 정치시간을 늘림(1박)

③ Trial 3: 중간층이 형성되기 때문에 소금물 첨가

④ Trial 4: 여전히 중간층이 남아 있어서 반응기 온도를 40°C까지 상승하면서 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 함유되어 있던 EGCG의 량이, 용매분배 시 물층으로 분배되는 손실 없이, 거의 EA층으로 회수된 것으로 판단된다(EGCG 순도는 대략 65%).

(나) 분리정제 크로마토그라피 공정 과정의 최적조건 검토

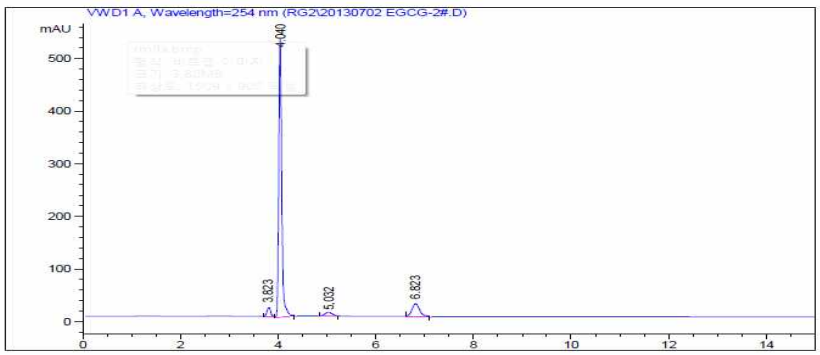
문제점: 이 과정에서 카페인을 제거하기 위하여 20% EtOH를 사용하게 되는데 EGCG를 최대한 씻어내기 위하여 충분한 용출액을 사용하다보니 농축액이 증가하여 원가상승 요인이 됨. 또한 20% EtOH 용출액의 농축을 용이하게 하기 위하여 EA로 용매분배하게 되는데 일부 EA가 물층에 포함됨으로 해서 폐수로 버리지 못하고 환경 오염 우려상 폐액으로 처리하다보니 처리 비용 증가를 감수해야 한다.

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 고형화 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 방법을 권한다.

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

Diaion HP-20 크로마토그라피 방법 개선 후 HPLC분석 결과



정량분석결과, 추출물에 함유 되어 있던 EGCG의 량이, 카페인 분획물에 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.

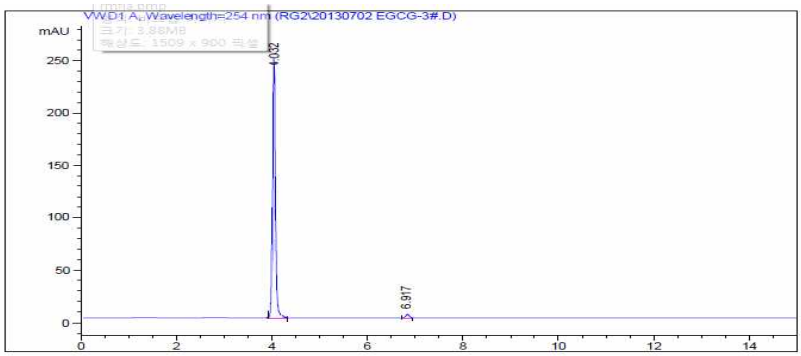
① Trial 1: 재결정 수율을 높이기 위하여 상등액을 반복적으로 재결정함으로써 회수율을 높일 수 있으며 결국 수율이 상승한다.

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 EGCG의 량이 3회 반복 재결정화를 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 ℃에서 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. 이에 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 ㎛) (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였다. HPLC 분석에 사용한 caffeine 및 (+)-catechin (C), (-)-epigallocatechin(EGC), (-)-epicatechin(EC), (-)-epigallocatechin gallate (EGCG), (-)-gallocatechin gallate(GCG), (-)-epicatechin gallate(ECG)는 Sigma-Aldrich (MI, USA)사에서 구입하 였다. HPLC 용 용매는 J.T Baker(water, MeOH) 및 Tedia(acetonitrile)제품 을 사용하였다.

나. HPLC를 이용한 'EGCG 고함유 녹차추출물' 의 분석법

HPLC 분석 전 시료 액은 증류수로 희석 후 0.45 ㎛ syringe filter (0.45mm HV, Durapore®)로 여과한 후 기기에 주입하였다. 이동상으로는 15 % acetonotrile in 0.1% acetic acid 용액을 1.0 ml/min의 유속으로 용출시켰다. 시료 주입량은 20 ㎕로 하였으며, Oven(AT-4000 Column Oven, Futecs)의 온도는 35 ℃로 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 ℃, 45 ℃, 50 ℃, 80 ℃에서 6 시간 추출하고 추출액 aliquot을 취하여 증류수로 희석한 후 0.45 ㎛ 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 ℃에서 6 시간 동안 추 출하였다. 추출액 1.25 L, 1.50 L, 1.75 L을 따로따로 취하여 미리 H^+ form으로 치환시켜둔 강산성 양이온수지 (Trilite SCR-B) column(4 L, ∅16 x 20 cm)에 각각 분당 20 ml씩 loading하였다. 용출액 aliquot 를 취하여 증류수로 희석 후 0.45 ㎛ syringe filter(0.45mm HV, Durapore®)로 여과한 후 HPLC 기기에 주입하여 caffeine의 존재유무 를 확인하였다. (Fig 3)

또, 추출액 1.50 L 을 미리 H^+ form으로 치환시켜둔 강산성 양이온수 지 (Trilite SCR-B) column(4 L, ∅16 x 20 cm)에 각각 분당 20 ml, 30 ml, 40 ml, 50 ml씩 loading하였다. 용출액을 증류수로 희석 후 0.45 ㎛ syringe filter(0.45mm HV, Durapore®)로 여과한 후 HPLC 분석 을 통하여 caffeine의 존재유무를 확인하였다. (Fig 3). 또 추출액 1.50 L을 미리 H^+ form으로 치환시켜둔 강산성 양이온수지 (Trilite SCR-B) column(4 L, ∅16 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 ㈜알앤오식품에 보관되어 있다. 개방형 추출조에서 시료 100 g에 증류수 1.5 L를 가한 후 60 ℃에서 6 시간씩 2회 반복추출하고 추출액은 여과지로 여과 후 여액 3 L을 동량의 ethylacetate(EA)로 추출하고 EA층을 농축하였다. 농축된 EA층을 증류수 2 L에 현탁시킨 후 Diaion HP-20 column(100 ml, ∅4.0 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 ℃에서 6 시간씩 2회 반복추출하고 추출액은 여과 후 여액을 미리 H^+ form으로 치환시켜 둔 Trilite SCR-B column (4 L, ∅16 x 20 cm)에 분당 40 ml로 loading 하였다. 이후 column을 증류수 10 L로 세척하였으며 용출액과 세척액을 합하여 즉시 Diaion HP-20 column (∅4.0 x 15 cm)에 서서히 주입하여 흡착시켰다. 이후 Diaion HP-20 column을 증류수로 수회 세척한 후 10 % 주정, 20 % 주정, 30 % 주정용액을 각각 400 L 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 탱

크형태로 제작되어 있으며 시중에서 가장 널리 사용되고 있다. 그러나 최소량(10배)의 물을 추출용매로 사용하여 건조 녹차를 대형농축기 내에서 추출할 경우 EGCG를 포함한 차카테친 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 ℃에서 6 시간 동안 추출한 추출물의 경우 EGCG와 gallocatechin gallate(GCG)의 비율이 3 : 1 정도로 나타났다. 이와 같은 결과는 Ikeda[2] 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 분만 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 최소화될 수 있는 추출온도를 설정하고자 추출온도에 따라 EGCG가 GCG로 전환되는 비율을 검토하여 보았다. 그 결과 Fig 2와 같이 추출온도를 각각 35 ℃, 45 ℃, 50 ℃, 80 ℃에서 6 시간 추출하여 얻은 추출물의 HPLC 분석결과를 살펴보면 추출온도가 45 ℃ 이하에서는 EGCG의 일부가 GCG로 전환되는 현상이 관찰되지 않았으나 추출온도가 50 ℃ 이상에서는 GCG가 생성되기 시작하였으며 추출온도를 80 ℃로 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 ℃ 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 대량생산 system에서는 EGCG와 함께 상당량의 caffeine이 함께 용출되며 혼입된 caffeine을 완제 제거하기 위하여 chromatography를 여러번 반복할 경우 발생되는 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 교환수

지, 강염기성 음이온 교환수지 등)들은 흡착능이 미미하여 제조공정에 적용할 수가 없었다. 따라서 EGCG 정제과정 이전에 녹차추출물에 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, ∅16 x 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 알아보고자 증류수로 Trilite SCR-B 수지를 세척하고 이 때 용출되는 세척액을 순차적으로 100 ml씩 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 확인 활 수 있었다. (Fig 4) .Trilite SCR-B 수지를 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 실시하므로서 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 녹차열수추출물로부터 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 ℃ 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.

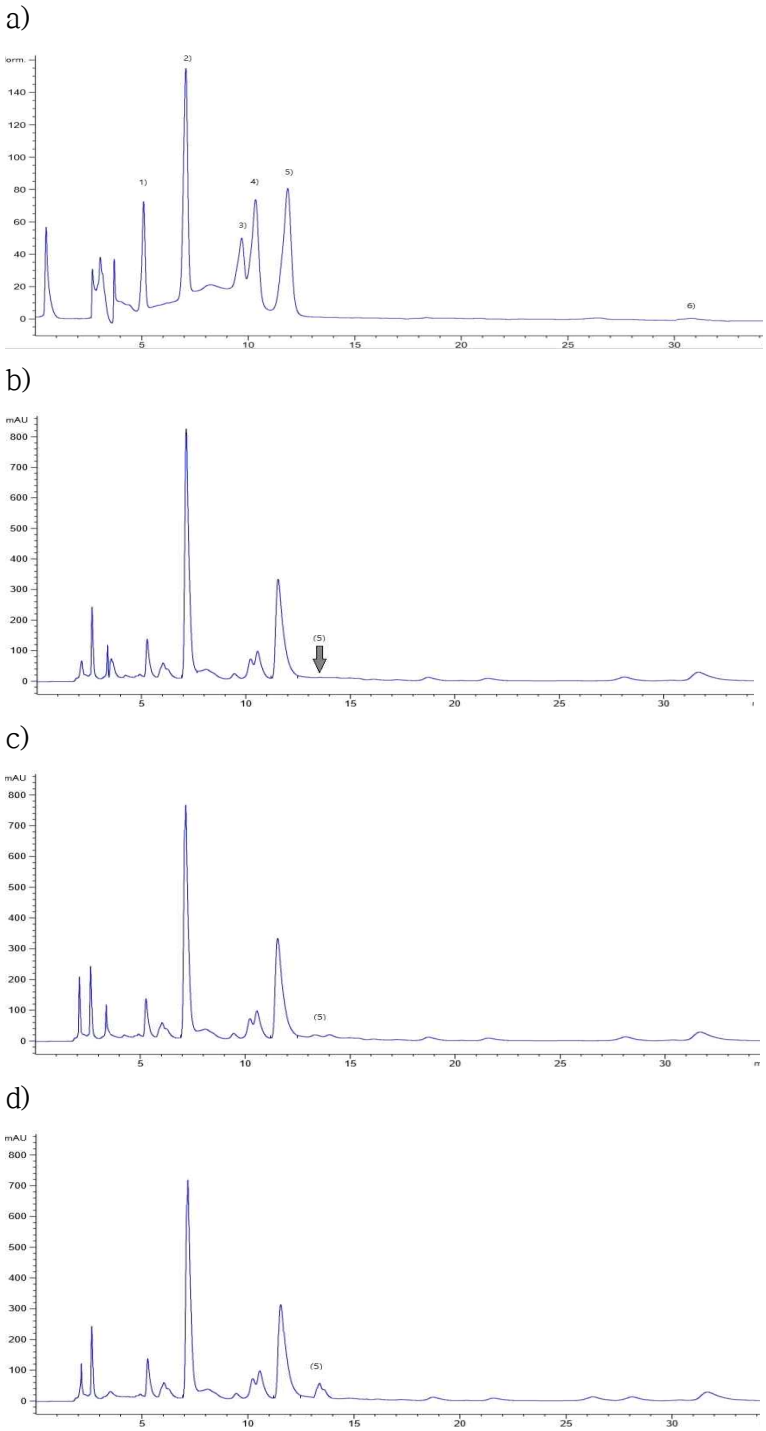
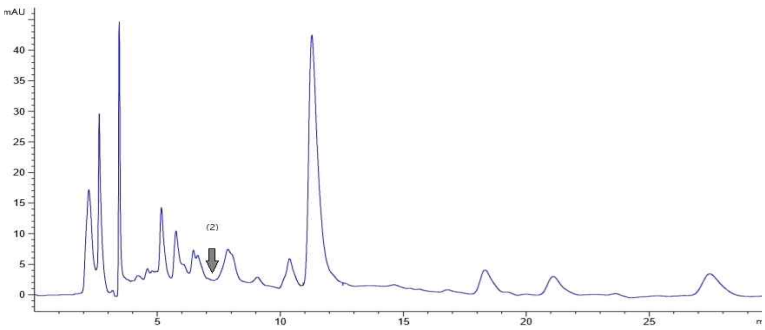
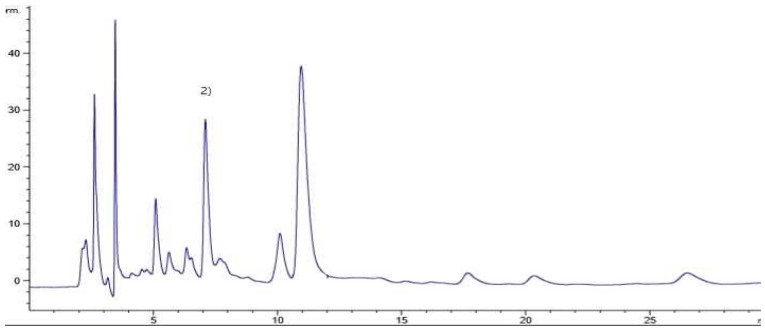


Fig. 2. HPLC chromatogram of a) standard 5 catechins, GCG and caffeine b) whole extract of green tea extracted at 45 ℃, c) whole extract of green tea extracted at 50 ℃ d) whole extract of green tea extracted at 45 ℃ HPLC: column; kromasil 100-5-C18 (4.6 X 250) mobile phase; 15 % acetonitrile in 0.1%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

a)



b)



c)

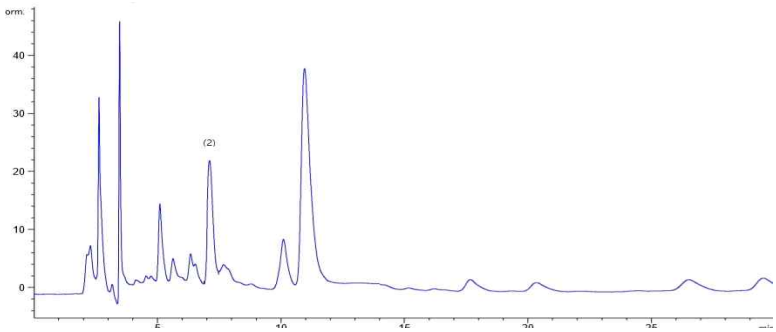


Fig. 3. HPLC chromatogram of a) eluate passed through cation exchange resin loaded with 1.5 L of green tea extract with a flow rate of 30 ml/min b) eluate passed through cation exchange resin loaded with below 1.75 L of green tea extract with a flow rate of 30 ml/min a) eluate passed through cation exchange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

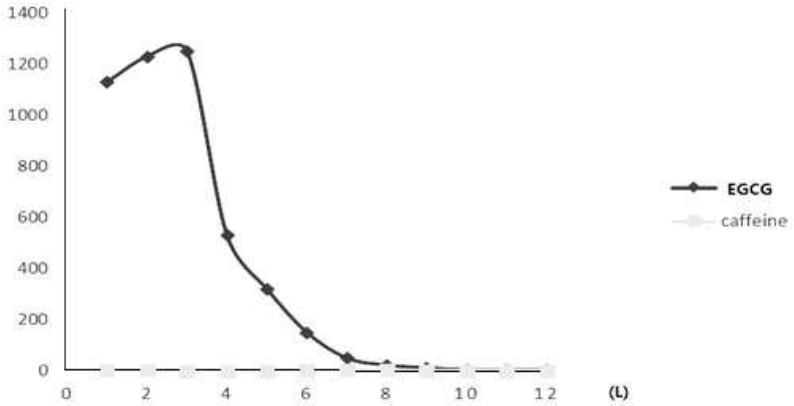
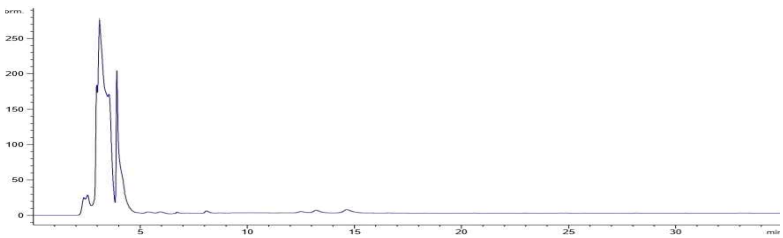
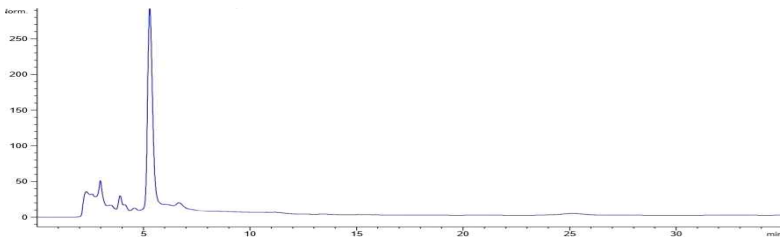


Fig. 4. EGCG and caffeine content in each 100 ml eluate passed through cation exchange resin

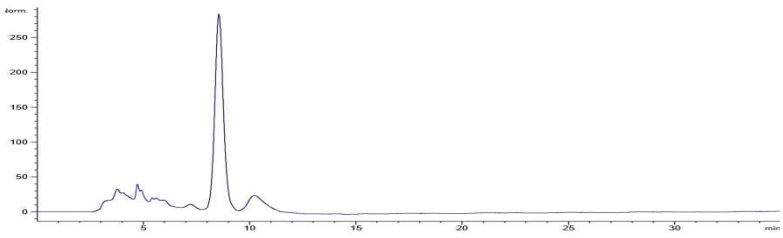
a)



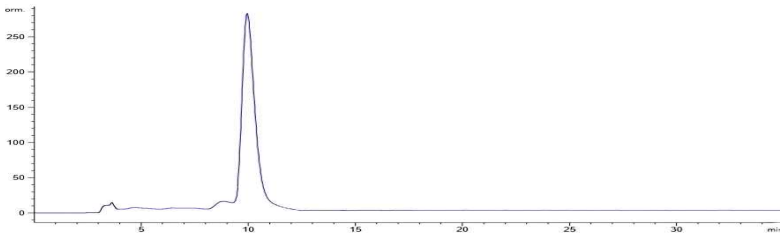
b)



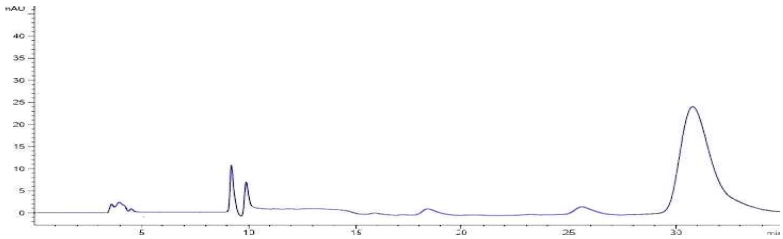
c)



d)



e)



f)

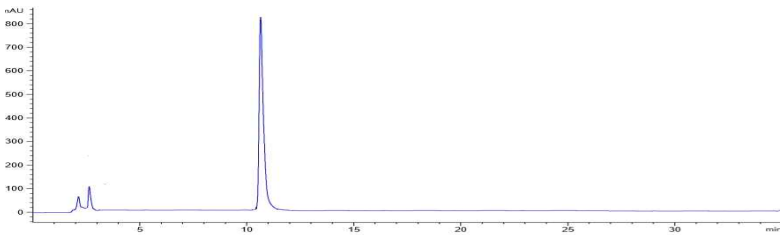


Fig. 5. HPLC chromatogram of a) eluate eluted with H_2O, b) eluate eluted with 10 % EtOH, c) eluate eluted with 15 % EtOH, d) eluate eluted with 20 % EtOH, e) eluate eluted with 25 % EtOH, f) GTE obtained from eluate eluted with 20 % EtOH.

제5절 녹차소재의 점진적 양산화 및 시생산(Pilot)

1. 개요

실험실 수준의 제조 기준이 그대로 대량생산에 적용되기는 쉽지 않기 때 때문에 불량률을 최소화하기 위해서 점차적으로 생산량을 늘려가며 표준 공정 기준을 새롭게 설정하고자 한다. 한 예로, 소규모 단위의 분리정제 시 Diaion HP-20 크로마토그라피에서 물-주정계로 카테킨이 잘 분획되던 것이 Pilot 수준에서는 카테킨 분획물에 카페인이 혼입되는 현상이 나타나서 탈카페인(decaffeined)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:녹차 건엽 2톤, 4차:녹차건엽 5톤으로부터 고순도 EGCG 소재를 반복, 생산하였다.

가. 추출공정(추출기, 농축기)

나. 용매분배공정(용매분배기, 농축기)

다. 분획공정(크로마토그라피, SUS컬럼, 농축기)

라. 재결정화공정(재결정기)

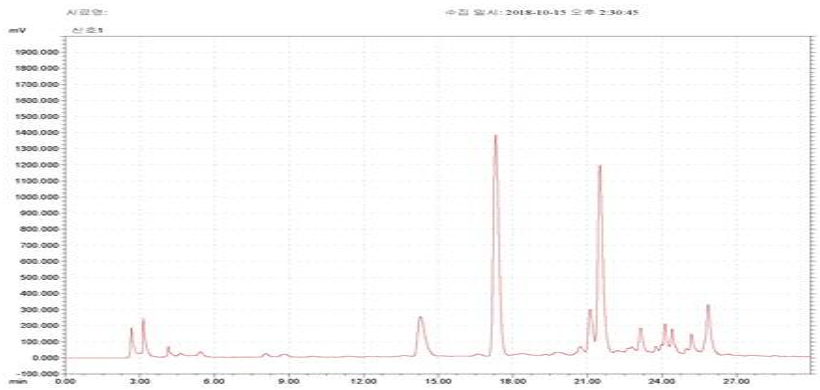
3. 결과

가. 점진적 양산화 과정에서의 단계별 소요시간, 수율

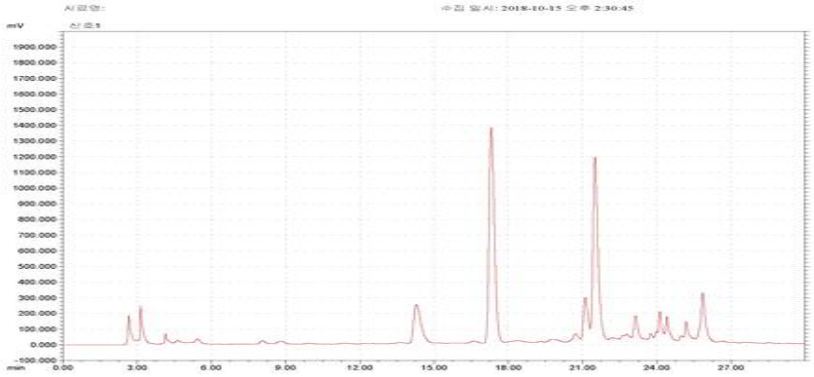
원료량 (녹차건엽)	공정별	소요 시간	생산비용 (재료비,천원)	최종 products 무게	수율
100kg (보성산, 건조엽)	추출및농축 분배및농축 분획및농축 재결정및동결건조	4 day 3 day 9 day 12 day	12,200	5.6kg	5.60%
500kg (보성산, 건조엽)	추출및농축 분배및농축 분획및농축 재결정및동결건조	4 day 3 day 9 day 12 day	18,420	26.5kg	5.31%
2톤 (보성산, 건조엽)	추출및농축 분배및농축 분획및농축 재결정및동결건조	5 day 5 day 10 day 14 day	26,440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



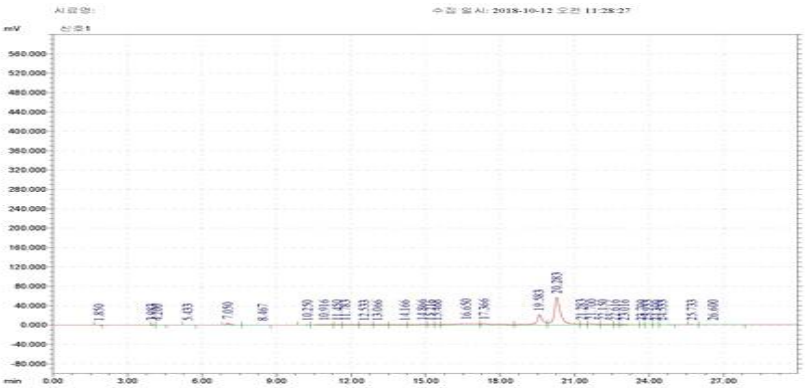
(2) 용매분배 상측액(EA) 분석자료(2단계 공정)



(3) Diaion HP-20 분획별 분석자료(3단계 공정)

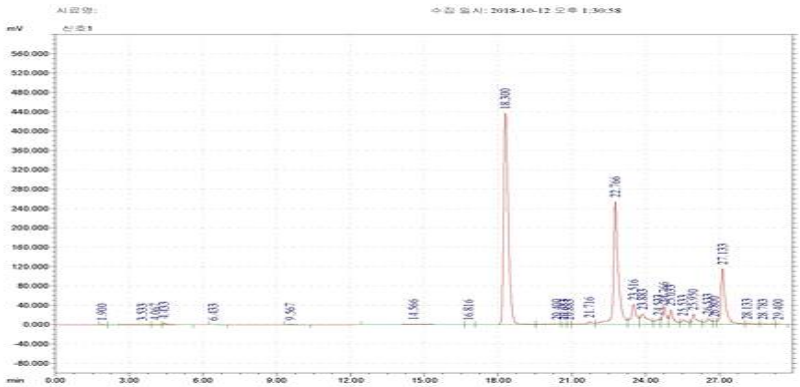
(가) H_2O층 500ml 1/20희석

(나) 10% EtOH층 500ml 1/20희석

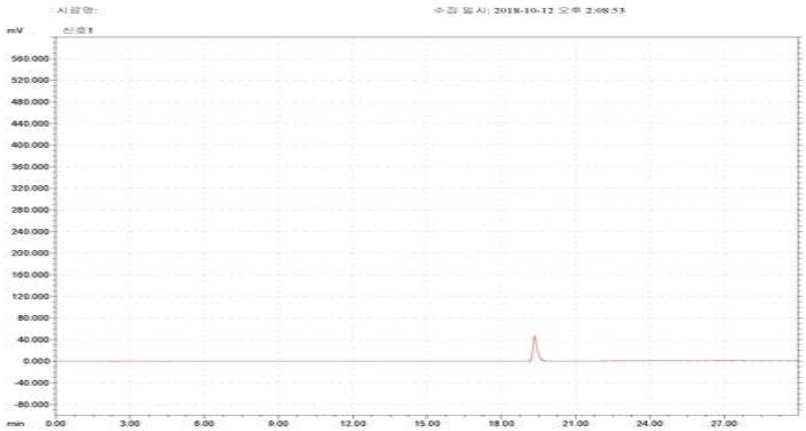


(다) 20% EtOH층 500ml 1/20희석

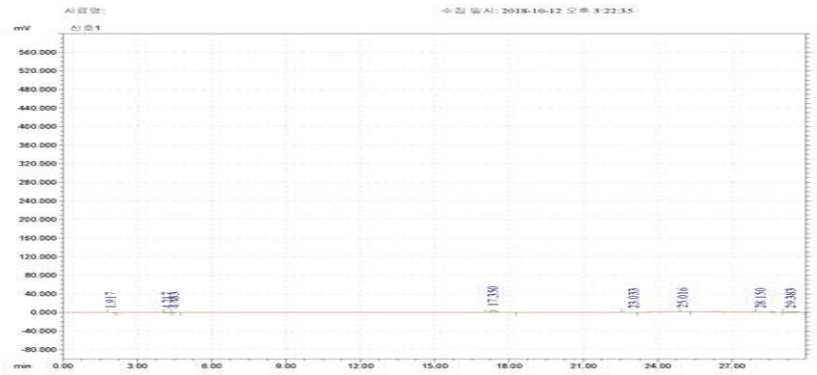
(라) 30% EtOH층 500ml 1/20희석



(마) 100% EtOH층 500ml 1/20희석

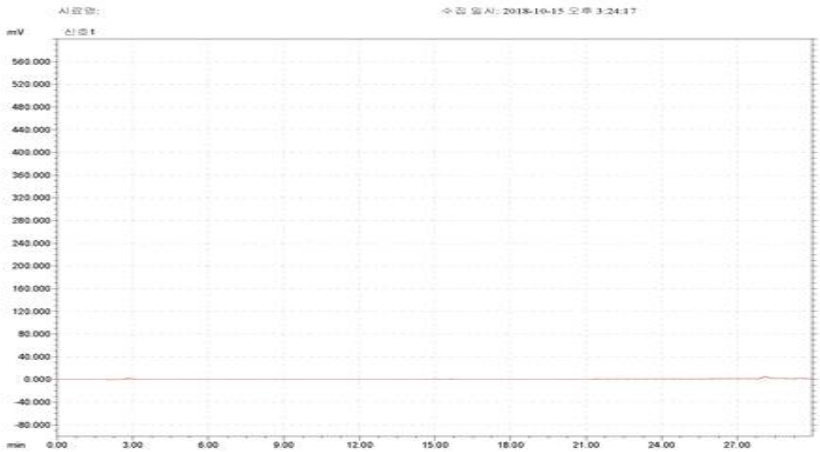


(바) 100% MeOH층 500ml 1/20희석



(사) 2N NaOH층 500ml 1/20희석

(아) 100% MeOH층 500ml 1/20희석



이상에서와 같이 Diaion HP-20 크로마토그라피 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 생체이용율
*생체이용율(bioavailability): 같은 약물이라도 결정형, 순도, 제제형태, 부형약제의 종류에 따라 생리학적 효과(흡수성, 삼투성 증)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(partiton 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 p가 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 포뮬레이션 측면에서의 적용(결과)

EGCG소재를 투여하기 적합한 형태와 형상으로 조재하기 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: 37oC +/- 0.5 oC
-용출액량: 500ml
-회전속도: 100rpm
-용출시간: 20hr

(2) 시험조건

-검액: 용출 시작후 각 ㅌ측정시간마다 용액을 채취하여 10um필터로 여과 후 이 용액을 검액으로 사용하였다.

-측정시간에 따른 방출 조건

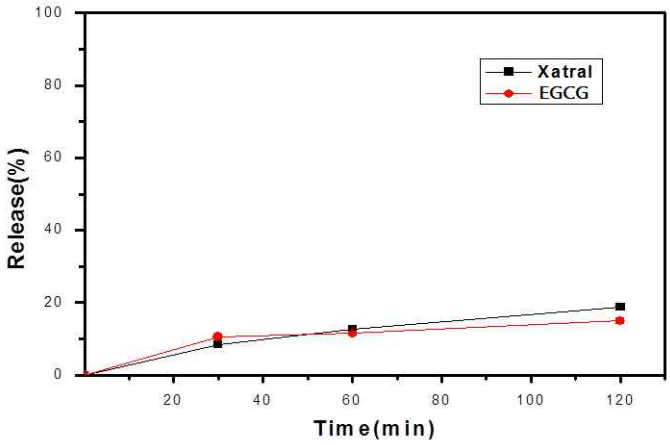
1 hr: 10~20%
6 Hr: 40-55%
12 hr: 65~85%
20 hr: 85% 이상

-HPLC를 이용하여 용출된 약물의 농도를 계산한다.

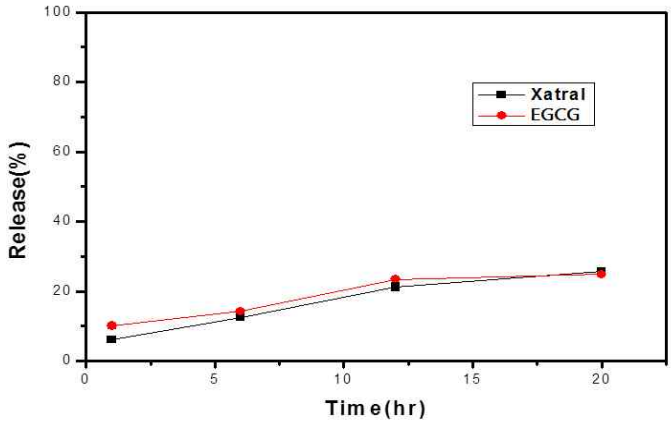
(3) 비교용출시험

-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

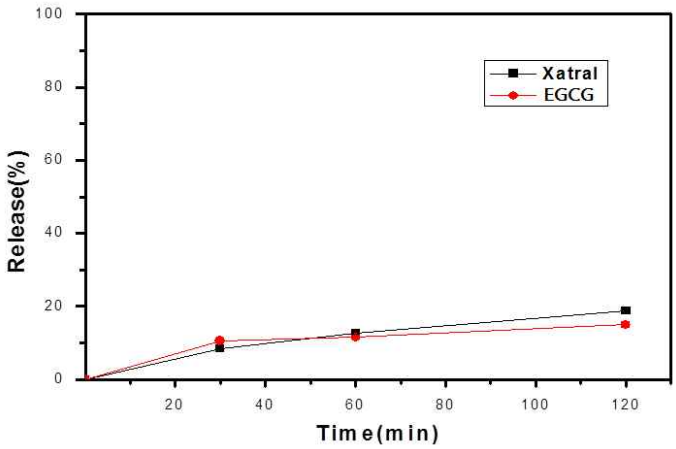
(가) pH 1.2, 50 rpm 용출시험결과



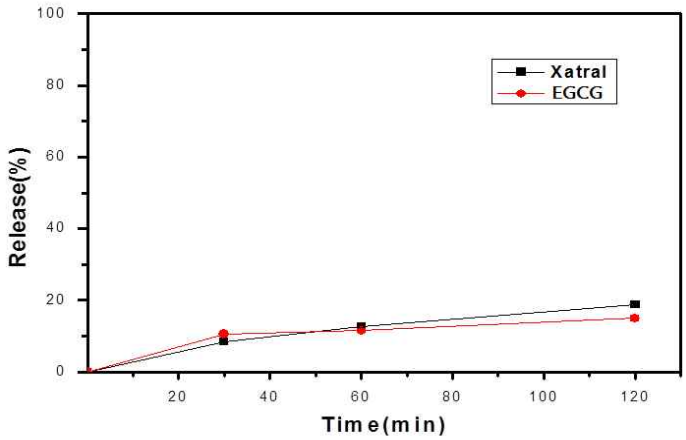
(나) pH 4.0, 50 rpm 용출시험결과



(다) pH 6.8, 50 rpm 용출시험결과



(라) Water, 50 rpm 용출시험결과



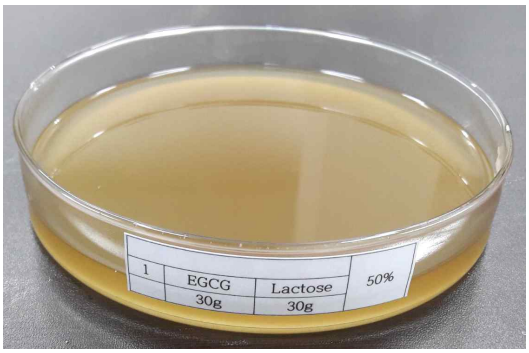
용출시험결과, 기준 용출액과 비교용출을 시험하였으며 모든 용출액에서 대조약과 유사한 약물 방출 결과를 유도할 수 있었음. In vitro상에서의 용출결과로 볼 때, In vivo 상에서도 대조약과 가튼 생물학적 동등성을 입증할 것으로 판단된다.

라. 물리적 형태

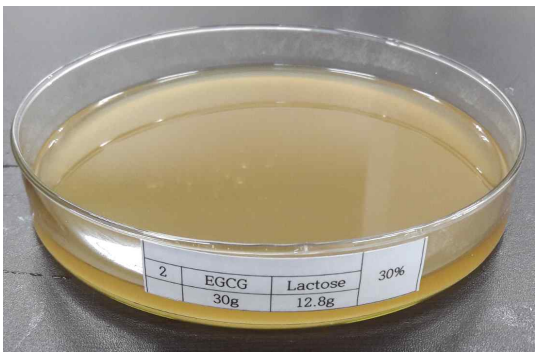
EGCG소재는 제조, 건조 시 가열할 경우 갈변현상이 뚜렷하기 때문에 동결건조를 원칙으로 함. 그러다보니 건조된 케익을 분쇄하면 분말이 가벼워 날릴 정도여서 캡슐화가 결코 쉽지 않음. 따라서 용출속도에 영향을 주는 EGCG 자체 약물의 결정성, 무정형, 입자 크기는 별다른 의미가 없다.

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, 셀루로우스, 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)



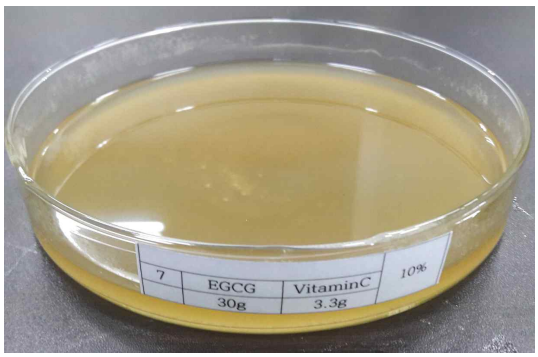
(3) EGCG/Lactose (80:20)

(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 편이에서 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)
식품의유형: 건기식캡슐형, 체지방감소와 피부건강에 도움을 줄 수 있는 카페인 무 함유 건강기능식품
원재료명 및 함량: 녹차 유래 천연성분 EGCG (98%) 및 ECG(2%)
제조일로부터 6개월
원산지: 한국 / Made in Korea
다이어트·피부건강 개선
알오고
프리미엄
Caffeine-free
체지방감소
보습/기능
135 mg (120캡슐)
Alogo premium
알오고(Alogo) 제품 특징
1. 체지방 감소 / 보습 기능
2. 차카테킨 일종의 고순도 EGCG(98%) 천연소재
3. 지방 흡수 억제작용에 의한 비만 억제, 체내 에너지 소비량 증가, 복용 후 운동시 체중 감량 속도 배가 효과
4. 카페인 無 함유 (caffeine-free)
5. 친환경적 재경정 공법에 의해 제조
보관방법
섭취량 및 섭취 시 주의사항
1일 1~2회, 1회 1캡슐


다이어트·피부건강 개선
알오고
프리미엄
Alogo
premium
알오고(Alogo) 제품 특징
Caffeine-free
체지방 감소
보습 기능
135 mg (60캡슐)
1. 체지방 감소 / 보습 기능
2. 차카테킨 일종의 고순도 EGCG(98%) 천연소재
3. 지방 흡수 억제작용에 의한 비만 억제, 체내 에너지 소비량 증가, 복용 후 운동시 체중 감량 속도 배가 효과
4. 카페인 無 함유 (caffeine-free)
5. 친환경적 재경정 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
green tea extract containing 98% EGCG
Alogo
premium
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 product.
Keep out of the reach of children
Caffeine-free
Body fat diets
Moisturizing
135 mg (60 capsules)
Supplement Facts

3. 단상자 설계및제작


알오고 골드
다이어트·피부건강 개선
Alogo
GOLD
다이어트·피부건강 개선
알오고
골드
Caffeine-free
9 g (900mg x 10캡스)

[제품1] 원료제품

[제품2] 커피맞춤형 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 경질캅셀로 내용물은 연갈색의 고운 분말
붕해 : 20분이내(캅셀 붕해 기준)
수분 : 10% 이내(내용물 수분)
대장균군 : 음성
<근거_건강기능식품 공전 규격>

2018.09.17

제품명	(위약)녹차EGCG 임상 제품_380mg/전북대							
유형	개별인정형 임상용 제품							
내용량	380mg*98일(12주)* 진약60명(5,880cap/2.234kg)/위약40명(3,920cap)							380 mg
섭취량	1일1회, 1회 1캅셀 암녹색 경질 캅셀						lot.No 180901-T02	
제조단위(갑)	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 경질캅셀

1. 성분 및 배합비율

NO	원료명	규격	배합비율	함량(mg)	투입량(g)	팩단위	자재량	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 : 제조일로 부터 2년**

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

JIF 전라북도생물산업진흥원 Jeonbuk Institute for Food-Bioindustry

2018.09.17

제품명	(진약)녹차EGCG 임상 제품_380mg/전북대							
유형	개별인정형 임상용 제품							
내용량	380mg*98일(12주)* 진약60명(5,880cap/2.234kg)/위약40명(3,920cap)							380 mg
섭취량	1일1회, 1회 1캅셀 암녹색 경질 캅셀							lot.No 180901-T01
제조단위(갑)	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 경질캅셀

1. 성분 및 배합비율

NO	원료명	규격	배합비율	함량(mg)	투입량(g)	팩단위	자재량	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 : 제조일로 부터 2년**

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

JIR 전라북도생물산업진흥원 Jeollabuk Institute for Food Bioindustry

전라북도생물산업진흥원

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플 위약

검토자	승인자
이지영	고대강

제 품 명	EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플	제품유형	암녹색의 경질캡셀
제조번호	171024-02	제조일자	2017. 10. 24
생 산 량	4,000캡슐	포장단위	4.9 PTP/box * 각 80ea씩

1. 칭 량 (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)	구태정	이지영
		결정셀룰로오스	96.4	2472.6	2472.6		
		적색색소	3.5	89.8	89.8		
		이산화규소	0.1	2.6	2.6		
		합 계	100.0	2565.0	2565.0		
비고							

2. 혼 합 (작업 일시 : 2017. 10. 17)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
소용량 균질 혼합기	◎ 혼합 원료 - 결정셀룰로오스 2,472.6g - 적색색소 89.8g ◎ 작업 조건 - 교반기속도 20rpm - 30분간 실시함.	혼합 원료 원부재료명 / 기준량(g) / 사용량(g) 결정셀룰로오스 / 2472.6 / 2472.6 적색색소 / 89.8 / 89.8 합 계 / 2562.4 / 2562.4 혼합기 운전내용 작업일시 / 점검시간 / 교반속도 2017.10.17 / 10:00 / 20rpm 2017.10.17 / 10:15 / 20rpm 2017.10.17 / 10:30 / 20rpm	구태정	이지영
비고				

전라북도생물산업진흥원

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플 위약

검토자	승인자
이재경	권대영

3. 건 조 (작업 일시 : 2017. 10. 17)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
열풍건조기	◎ 건조 원료 - 결정셀룰로오스 2,472.6g - 적색색소 89.8g ◎ 작업 조건 - 건조 온도 60℃ - 30분간 실시함.	건조 원료 원부재료명 / 기준량(g) / 사용량(g) 결정셀룰로오스 / 2472.6 / 2472.6 적색 색소 / 89.8 / 89.8 합 계 / 2562.4 / 2562.4 건조기 운전내용 작업일시 / 점검시간 / 건조 온도 2017.10.17 / 13:00 / 60°C 2017.10.17 / 14:00 / 60°C 2017.10.17 / 15:00 / 60°C 2017 10.17 / 16:00 / 60°C 2017.10.17 / 17:00 / 60°C	차효경	이재경
비고				

4. 후혼합 (작업 일시 : 2017.10.18)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
소용량균질혼합기	◎ 혼합 원료 - 건조된 결정셀룰로오스, 적색색소 혼합물 2,562.4g - 이산화규소 2.6g ◎ 작업 조건 - 교반기속도 20rpm - 30분간 실시함.	혼합 원료 원부재료명 / 기준량(g) / 사용량(g) 건조 혼합물 / 2562.4 / 2,562.4 이산화규소 / 2.6 / 2.6 합 계 / 2565 / 2565 혼합기 운전내용 작업일시 / 점검시간 / 교반속도 2017.10.18 / 10:00 / 20 rpm 2017.10.18 / 10:15 / 20 rpm 2017.10.18 / 10:30 / 20 rpm	차효경	이재경
비고				

전라북도생물산업진흥원

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플 위약

검토자	승인자
이정희	김대중

5. 충 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 충 진 기	◎ 충진조건 - 불투명한 0호의 암녹색 캡셀 사용 - **개별중량(1cap) 380mg±3%** **: 368mg ~ 392 mg** - **평균중량(10cap) 3,800mg±3%** **: 3,680mg ~ 3,920mg** - 캡슐뚜껑 닫힘 상태 확인	1	378	382	381	375	382	3801	최태경	이정희
			376	384	386	376	384			
		2	391	386	385	391	386	3845		
			396	384	386	376	384			
		3	385	389	388	385	389	3830		
			389	385	380	389	385			
		4	391	386	385	391	386	3863		
			384	385	386	384	385			
		5	396	384	386	376	384	3830		
			384	385	386	384	385			
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 - 캡슐상태확인(눌림,깨짐) - 캡슐뚜껑 닫힘상태 확인	· 캡슐 상태 시험 · 이물질 시험 · 시험후 재선별 실시	최태경	이정희
비고				

전라북도생물산업진흥원

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플 위약

검토자	승인자
이지은	김대중

7. PTP포장 (작업 일시 : 2017. 10. 20)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
브리스터 포장기	◎ PTP 포장조건 - 10개 캡셀씩 포장 - 이물질 확인 - 캡슐상태 확인 - 접착상태확인 - 400개 수량 생산(위약)	· 10캡슐 / 1 PTP 포장실시 · 400 PTP 생산	차은정	이지은
비고				

8. Box포장 (작업 일시 : 2017. 10. 24)

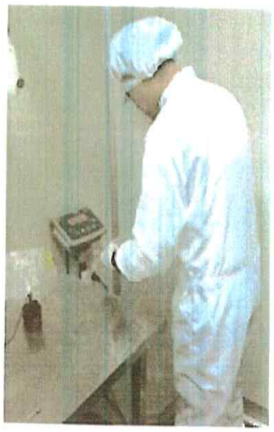
사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
-	◎ BOX 포장조건 - 1차분, 2차분 각각 40박스 포장	· 1차분 : 4오일 + 여백 1일 포장하여 40캡슐 1box에 포장. · 2차분 : 4오일 + 여백 1일 포장하여 40캡슐 1box에 포장	차은정	이지은
비고				

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플

검토자	승인자
이재원	김대규

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 ANALYIS NO.	P-201711-02
제 조 수 량 LOT SIZE	4,000 Cap	시 험 일 자 ANALYIS DATE	2017. 11. 01.
제 조 일 자 MFD.DATE	2017. 10. 24.	시 험 방 법(규격) ANALYIS 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 암녹색경질캅셀	적 합	한금철
수 분	10 % 이내	(8.7 ± 0.1) %	한금철
중 량 편 차	380 mg ± 10 %	적 합	한금철
대 장 균 군	음 성	음 성	이미선
붕 해 시 험	20 분 이내	적 합	한금철
	(이하여백)		

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

STD-QC0201-F04

JIF 전라북도생물산업진흥원
Jeonbuk Institute for Food Bioindustry

전라북도생물산업진흥원

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플 진약

검토자	승인자
이지영	고대강

제 품 명	EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플	제품유형	암녹색의 경질캡셀
제조번호	171024-01	제조일자	2017. 10. 24
생 산 량	4,000캡슐	포장단위	4.9 PTP/box * 각 80ea씩

1. 칭 량 (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)	고대강	이지영
		녹차추출물	50.0	1282.5	1282.5		
		결정셀룰로오스	49.8	1277.3	1277.3		
		CMC Ca	0.1	2.6	2.6		
		이산화규소	0.1	2.6	2.6		
		합계	100	2565.0	2565.0		
비고							

2. 혼 합 (작업 일시 : 2017. 10. 19)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용			작업자	확인자
소용량균질혼합기	◎ 혼합 원료 - 녹차추출물(1,282.5g) - 결정셀룰로오스(1,277.3g) - CMC Ca(2.6g) - 이산화규소(2.6g) ◎ 작업 조건 - 교반기속도 20rpm - 30분간 실시함	혼합 원료			고대강	이지영
		원부재료명	기준량(g)	사용량(g)		
		녹차추출물	1282.5	1282.5		
		결정셀룰로오스	1277.3	1277.3		
		CMC Ca	2.6	2.6		
		이산화규소	2.6	2.6		
		합계	2565.0	2565.0		
		혼합기 운전내용			고대강	이지영
		작업일시	점검시간	교반속도		
		2017.10.19	10:00	20rpm		
		2017.10.19	10:15	20rpm		
		2017.10.19	10:30	20rpm		
비고						

전라북도생물산업진흥원

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플 진약

검 토 자	승 인 자
이기동	김대경

3. 충 진 (작업 일시 : 2017. 10. 19)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용							작업자	확인자
		확인 횟수	개별중량(mg)					평균 중량 (mg)		
캡 셀 충 진 기	◎ 충진조건 - 불투명한 0호의 암녹색 캡셀 사용 - **개별중량(1cap) 380mg±3%** **: 368mg ~ 392 mg** - **평균중량(10cap) 3,800mg±3%** **: 3,680mg ~ 3,920mg** - 캡슐뚜껑 닫힘 상태 확인	1	375	382	381	375	383	3784	허태경	이기동
			396	396	380	375	384			
		2	385	385	384	396	381	3814		
			396	396	381	385	379			
		3	385	385	388	387	381	3838		
			387	387	380	387	381			
		4	388	388	380	387	387	3817		
			387	380	396	396	388			
		5	385	396	381	380	387	3823		
			381	381	380	387	385			
비고										

4. 선 별 (작업 일시 : 2017. 10. 20)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
캡 셀 선 별 기	◎ 선별조건 - 이물질 확인 - 캡슐상태확인(눌림, 깨짐) - 캡슐뚜껑 닫힘 상태 확인	ㆍ캡슐 상태 선별 ㆍ이물질 선별 ㆍ선별기 가동상태 점검	허태경	이기동
비고				

전라북도생물산업진흥원

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플 진약

검토자	승인자
이[illegible]	[illegible]

5. PTP포장 (작업 일시 : 2017. 10. 23)

사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
브리스터 포장기	◎ PTP 포장조건 - 10개 캡셀씩 포장 - 이물질 확인 - 캡슐상태 확인 - 접착상태확인 - 400개 수량 생산(진약)	· 10캡슐 / 1 PTP 포장 실시 · 41 PTP 생산	차효경	이[illegible]
비고				

6. Box포장 (작업 일시 : 2017. 10. 2X)

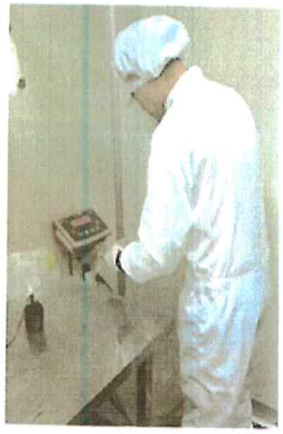
사용 설비	제조 지시 및 방법	작업 내용	작업자	확인자
-	◎ BOX 포장조건 - 1차분, 2차분 각각 40박스 포장	· 1차분 : 40box + 1box 여유분 포함하여 41캡슐 1box에 포장. · 2차분 : 40box + 1box 여유분 포함하여 41캡슐 1box에 포장	차효경	이[illegible]
비고				

제조지시 및 기록서

EGCG고함유 녹차추출물 임상샘플

검토자	승인자
이정기	김대경

임. 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" 진약		
제 조 번 호 LOT NO.	171024-01	시 험 번 호 ANALYIS NO.	P-201711-01
제 조 수 량 LOT SIZE	4,000 Cap	시 험 일 자 ANALYIS DATE	2017. 11. 01.
제 조 일 자 MFD.DATE	2017. 10. 24.	시 험 방 법(규격) ANALYIS 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 암녹색경질캅셀	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 군	음 성	음 성	이미선
붕 해 시 험	20 분 이내	적 합	한금철
	(이하여백)		

판정결과 Results	확인 Checked by	승인 Approved by	승인일자 Date
적 합	한금철	김 혁	2017. 11. 8

STD-QC0201-F04

JIF 전라북도생물산업진흥원
Jeonbuk Institute for Food Bioindustry

제9절 항산화/항당뇨/인지기능개선 전임상시험 및 작용 기전 연구

1. 고순도 EGCG의 항산화 효능 연구

가. 고순도 EGCG의 항산화 효능에 대한 in vitro(세포배양) 연구

(1) 연구 방법

(가) 고순도 EGCG의 항산화 효능에 대한 평가를 세포수준에서 실시하였다. 본 실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행 (Korea)에서 구입하여 사용하였다. 동결된 RAW 264.7 세포를 50 ㎖ 튜브에 옮기고 PBS 9 ㎖을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상층액을 제거하였다. 세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% penicillin/streptomycin으로 조성된 DMEM 배지 1 ㎖을 넣어 부유시켜 세포배양기 (37℃, 5% CO_2) 에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

(나) DPPH radical 소거능은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 고순도 EGCG를 비롯한 시료의 최종 농도가 1, 10, 100, 500, 1,000 (㎍/㎖)의 농도로 될 수 있게 희석시켰으며, 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 ㎕와 시료를 각각 100 ㎕씩 혼합하여 세포배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 30분간 반응 시킨 후 517 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 대조군에 증류수를 넣었고 DPPH 용액의 대조군으로써는 에탄올을 넣어 보정값을 얻은 후 DPPH 자유라디칼 소거율을 아래의 식에 따라 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{소거율}(\%)=\left(\frac{\text{대조군의 흡광도}-\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right)\times 100$$

(다) ABTS radical 소거능은 다음의 방법으로 측정하였다. 고순도 EGCG를 포함하는 시료의 최종 농도가 1, 10, 100, 500, 1,000 (㎍/㎖)의 농도로 될 수 있게 희석시켰으며, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온 ($ABTS^{\cdot+}$)을 형성시킨 다음 732 ㎚에서 흡광도를 측정하여 흡광

도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하고, 희석된 ABTS·+ 용액 95 ㎕와 시료를 각각 5 ㎕ 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, 732 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 대조군에 증류수를 넣었으며, 대조군에 대한 ABTS 라디칼 소거율을 아래의 식에 따라 계산하여 백분율로 나타내었다.

$$\text{소거율 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{(시료 첨가군의 흡광도)}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

(2) 연구 결과

(가) 고순도 EGCG의 DPPH 소거능 평가

① 고순도 EGCG를 비롯하여 시료의 최종 농도가 1, 10, 100, 500, 1,000 (㎍/㎖)의 농도로 될 수 있게 희석 한 뒤, 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 ㎕와 시료를 각각 100 ㎕씩 혼합하여 세포배양기 (37℃, 5% CO2)에서 30분간 반응 시킨 후 517 ㎚에서 흡광도를 측정하였음. 대조군은 증류수를 사용하였으며 DPPH 용액의 대조군에는 에탄올을 넣어 보정값을 얻은 후 DPPH 자유라디칼소거율을 계산하여 백분율로 나타내었음.

② 그 결과 농도의존적으로 DPPH 소거능이 증가하는 것을 관찰하였음. 고순도 EGCG의 경우 100 ㎍/㎖의 농도에서 이미 최고의 항산화능을 나타냄. 저순도 EGCG와 고순도 EGCG의 항산화능을 비교하였을 경우 10 ㎍/㎖의 농도에서 8% 이상 고순도 EGCG의 항산화능이 더 강력하게 나타났음. 100 ㎍/㎖ 이상의 농도에서는 두 시료 모두 95% 이상의 DPPH 소거능을 나타냄.

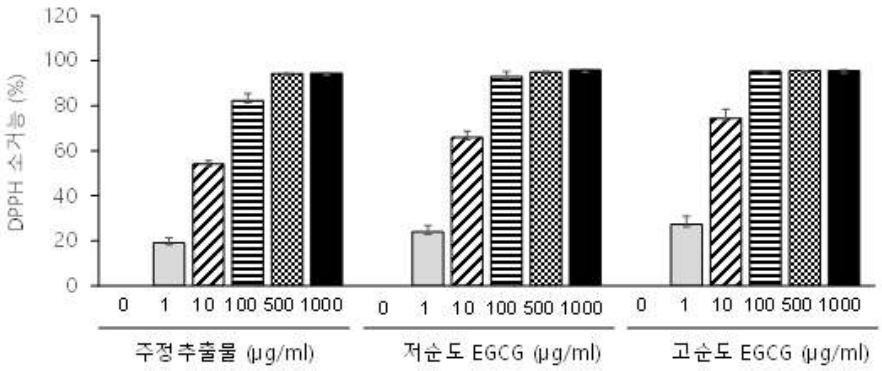


그림1. 고순도 EGCG에 의한 DPPH 소거능 평가

(나) 고순도 EGCG의 ABTS radical 소거능 평가

① ABTS radical 소거능은 고순도 EGCG를 포함하는 시료의 최종 농도가 1, 10, 100, 500, 1,000 (㎍/㎖)의 농도로 될 수 있게 희석한 뒤 ABTS 용액을 제조하고 암소에 하루 동안 방치하여 양이온 (ABTS·+)을 형성시킨 다음 732 ㎚에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하고, 희석된 ABTS·+ 용액 95 ㎕와 시료를 각각 5 ㎕ 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, 732 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

② 그 결과 고순도 EGCG는 10 ㎍/ml에서부터 50%이상의 ABTS 소거능을 나타내었으며 농도의존적으로 ABTS의 활성을 잘 억제하였다.

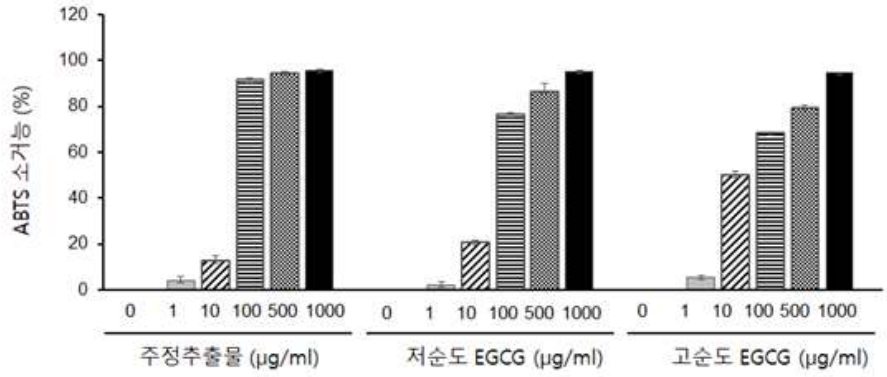


그림2. 고순도 EGCG에 의한 ABTS 제거능 평가

이상의 결과를 종합하면 고순도 EGCG를 저순도 EGCG 시료와 비교한 결과 DPPH 소거능과 ABTS radical 소거능에서 모두 5%이상의 효능이 우수하였음. 따라서 고순도 EGCG는 우수한 항산화 효능을 가지고 있었다.

2. 고순도 EGCG의 산화적 스트레스유도 동물모델 (in vivo)에서 항노화 효능평가

가. 연구방법

(1) 산화스트레스 실험동물모델의 제작

AAPH[2.2'-azobis (2-aminodinopropane) hydrochloride]에 의한 산화적 스트레스 유발 및 약물 투여 6주령의 수컷 Sprague-Dawley rat (SD rat)를 정상군(normal), 대조군(control), 양성대조군(ascorbic acid 또는 AA), 저순도 녹차추출물 (tea catechin 또는 T-C, 75, 150, 300 mg/kg), 고순도 EGCG (EGCG 또는 E, 75, 150, 300 mg/kg)으로 그룹을 나누어 각 군당 실험동물을 10마리씩 배정하여 실험을 시행하였다. 대조군은 50 mg/kg의 AAPH를 매일 1회씩 7일간 복강에 투여 하여 산화적 스트레스를 유발하였다. 저순도 녹차추출물과 고순도 EGCG는 AAPH에 의한 산화스트레스 유발 3일전부터 경구투여 하여, 총 10일간 약물을 투여하였다. 마지막 약물투여 및 AAPH에 의한 산화스트레스 유발 후 12시간 동안 절식을 시킨 뒤 실험동물을 치사하였다.

(2) 실험동물 치사 및 혈액 채취

마지막 약물투여 후 24시간 후에 실험동물을 마취한 다음 직접 심장채혈법으로 10 mL의 혈액을 포집하였다. 채혈한 혈액은 CBC bottle에 넣어 적혈구, 백혈구, 혈소판을 혈구분석기(CBC coulter counter)로 측정하였다.

(3) 혈장분리 및 혈액내 생화학지표 분석

채혈된 혈액의 일부는 6,500 rpm, 15분간 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리된 혈액내에 존재하는 LDL cholesterol, total bilirubin, albumin, glucose는 생화학분석기로 측정하였다.

(4) 간조직 분리

치사된 실험동물의 간 조직 일부를 적출한 후 Bansal 등의 방법)에 의해 4배의 150 mM의 KCl을 가하여 homogeniger를 이용하여 균질화하였다. 균질화한 조직을 1차 원심분리(1,000 rpm 20분)한 후 균질화 되지 않은 조직 등을 제거하고 2차 원심분리 (4,000 rpm 30분) 하여 상등액을 취하여 nitric oxide (NO), catalase를 측정하였고, 나머지는 3차 원심분리(20,000 rpm 1시간) 후 상등액을 취하여 SOD, malondialdehyde (MDA)를 측정하였다.

(5) SOD 활성 측정

Super Oxide Dismutase 활성은 SOD assay kit (Dojindo, Japan)을 이용하여 측정하였다. 간조직에 150 mM KCl을 관류시켜 적혈구를 제거한 뒤 0.1 M Tris/HCl, 0.5% Triton X-100, 5 mM β-mercap to ethanol, 0.1 mg/ml PMSF로 균질화 한 뒤 14,000 g, 4℃에서 5 분동안 원심분리하여 그 상등액을 취하였다. WST working solution 은 19 ml의 assay buffer에 1 ml의 WST solution을 희석하여 사용 하였다. enzyme working solution은 2.5 ml의 dilution buffer에 15 μl에 희석하여 반응에 사용하고 발색반응을 유도하였다. 발색의 정도는 450 nm에서 microplate reader로 흡광도를 측정한 후 SOD activity 를 계산 하였다.

(6) NO (nitric oxid) 측정

간조직에서 존재하는 nitric oxide의 양은 Nitric Oxide assay kit (Dojindo, Japan)을 이용하여 측정하였고, 450 nm에서 흡광도를 측정 한 후 NO의 함량을 계산하였다.

(7) Catalase 활성 측정

Catalase 활성도 측정은 Abei의 방법)에 따라 3.0 mL cuvette에 130 nm phosphate buffer (pH 7,0) 500 ㎕, 간 분획물 40 ㎕와 증류수 660 ㎕를 혼합하여 기질인 15mM H_2O_2 농도에 의한 흡광도의 감소율 을 측정하였다. 효소의 활성도는 1분 동안 1 μM의 H_2O_2를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

(8) GSH 정량 측정

간에서의 GSH-px 활성을 측정하기 위하여 간조직 100 mg을 0.5 ml 의 GST assay buffer에 넣고 homogenizer로 균질화 한 뒤 10,000 xg, 4℃, 15분 동안 원심분리하여 그 상등액을 사용하였다. 시료는 총 50 μl준비하고 GST assay buffer로 비율을 조정하여 사용하였다. 음 성대조군으로는 GST buffer를 50 μl 사용하였다. 저순도와 고순도 EGCG를 처리한 그룹 및 대조군은 모두 glutathione 5 μl를 더하여 사 용하였다. GST assay buffer와 GST substrate (CDNB) solution을 49:1의 비율로 혼합하여 EGCG처리군과 대조군에 각각 50 μl를 분주한

뒤 340 nm의 파장에서 1분 간격으로 적어도 5번 흡광도를 측정하였다. GST 활성도는 다음의 공식을 활용하였다.

ΔA340/min=[A340(Time2) - A340(Time1)] /[Time2 (min) - Time1 (min)]

GST activity = [Δ340 min-1 x reaction volume (ml)]/[0.0096 μmol-1cm-1 x 1000 ml x 0.2893 cm x V] x D

V = sample volume added to well (ml)

D = sample dilution factor

나. 연구결과

(1) 산화스트레스 모델에서 고순도 EGCG가 혈액내 적혈구의 수에 미치는 영향

(가) AAPH에 의해 산화스트레스가 나타난 실험동물의 혈액내 적혈구의 수에 고순도 EGCG가 미치는 영향을 확인하고자 실험동물의 혈액을 혈구분석기로 분석하였다.

(나) 그 결과 정상군에서는 8.12±0.05 $\times 10^6$ cell/μl이었으나 산화스트레스가 나타난 대조군에서 10.37±0.57 $\times 10^6$ cell/μl으로 증가하였다. 산화스트레스에 의해 저순도 EGCG를 포함하는 녹차추출물을 75, 150, 300 mg/kg의 농도로 투여한 실험동물의 혈액에서는 각각 9.52±0.39 $\times 10^6$ cell/μl, 9.35±0.62 $\times 10^6$ cell/μl, 9.40±0.16 $\times 10^6$ cell/μl 으로 나타났다, 반면 고순도 EGCG를 75, 150, 300 mg/kg의 농도로 투여한 실험동물의 혈액에서는 10.18±0.40 $\times 10^6$ cell/μl, 10.37±0.86 $\times 10^6$ cell/μl, 10.99±0.89 $\times 10^6$ cell/μl의 수를 나타내어 고순도 EGCG에 의해 RBC의 수가 약간 증가한 것으로 나타났다.

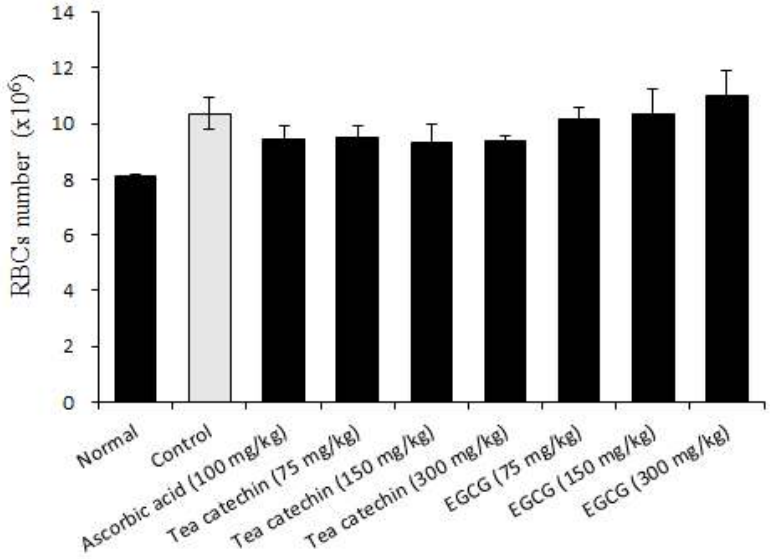


그림3. 산화스트레스 동물모델에서 고순도 EGCG가 혈액내 적혈구의 수에 미치는 영향

(2) 산화스트레스 모델에서 고순도 EGCG가 혈액내 백혈구의 수에 미치는 영향

(가) AAPH에 의해 산화스트레스가 나타난 실험동물의 혈액내 백혈구의 수에 고순도 EGCG가 미치는 영향을 확인하고자 실험동물의 혈액을 혈구분석기로 분석하였다.

(나) 그 결과 정상군에서는 7.37±1.38 $\times 10^3$ cell/μl이었으나 산화스트레스가 나타난 대조군에서 9.50±0.98 $\times 10^3$ cell/μl으로 증가하였다. 산화

(다) 스트레스에 의해 저순도 EGCG를 포함하는 녹차추출물을 75, 150, 300 mg/kg의 농도로 투여한 실험동물의 혈액에서는 각각 6.18±1.92 $\times 10^3$ cell/μl, 7.14±1.57 $\times 10^3$ cell/μl, 6.05±2.22 $\times 10^3$ cell/μl 으로 나타났다, 반면 고순도 EGCG를 75, 150, 300 mg/kg의 농도로 투여한 실험동물의 혈액에서는 7.40±3.22 $\times 10^3$ cell/μl, 5.14±1.31 $\times 10^3$ cell/μl, 6.84±2.55 $\times 10^3$ cell/μl의 수를 나타내어 고순도 EGCG에 의해 WBC의 수가 약간 증가한 것으로 나타났다.

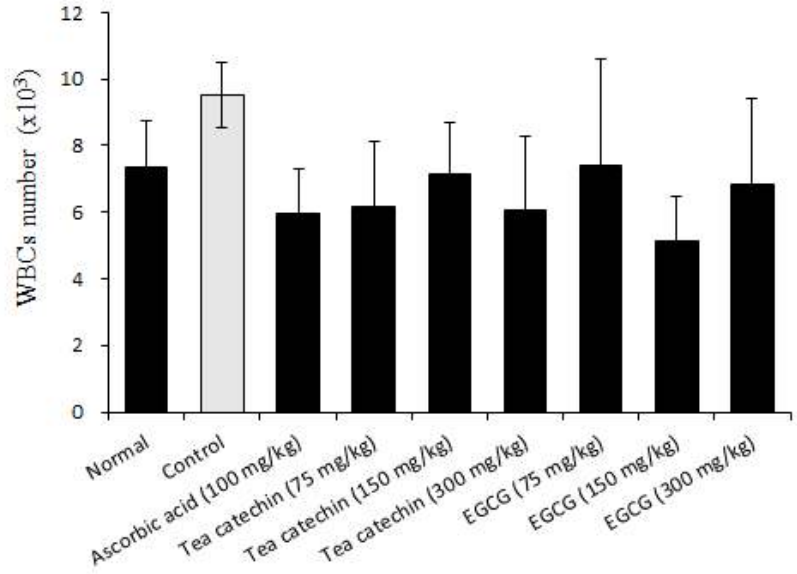


그림4. 산화스트레스 동물모델에서 고순도 EGCG가 혈액내 백혈구의 수에 미치는 영향

(3) 산화스트레스 모델에서 고순도 EGCG가 혈액내 혈소판의 수에 미치는 영향

(가) AAPH에 의해 산화스트레스가 나타난 실험동물의 혈액내 혈소판의 수에 고순도 EGCG가 미치는 영향을 확인하고자 실험동물의 혈액을 혈구분석기로 분석하였다.

(나) 그 결과 정상군에서는 1125±125 $\times 10^3$ cell/μl이었으나 산화스트레스가 나타난 대조군에서 1507±244 $\times 10^3$ cell/μl으로 증가하였다. 산화스트레스에 의해 저순도 EGCG를 포함하는 녹차추출물을 75, 150,

(다) 300 mg/kg의 농도로 투여한 실험동물의 혈액에서는 각각 1213±94 $\times 10^3$ cell/μl, 1319±158 $\times 10^3$ cell/μl, 1260±205 $\times 10^3$ cell/μl 으로 대조군에 비해 감소한 것으로 나타났다. 고순도 EGCG를 75, 150, 300 mg/kg의 농도로 투여한 실험동물의 혈액에서는 1326±185 $\times 10^3$ cell/μl, 1419±128 $\times 10^3$ cell/μl, 1476±106 $\times 10^3$ cell/μl의 수를 나타내어 고순도 EGCG에 의해 혈소판의 수가 약간 감소한 것으로 나타났다.

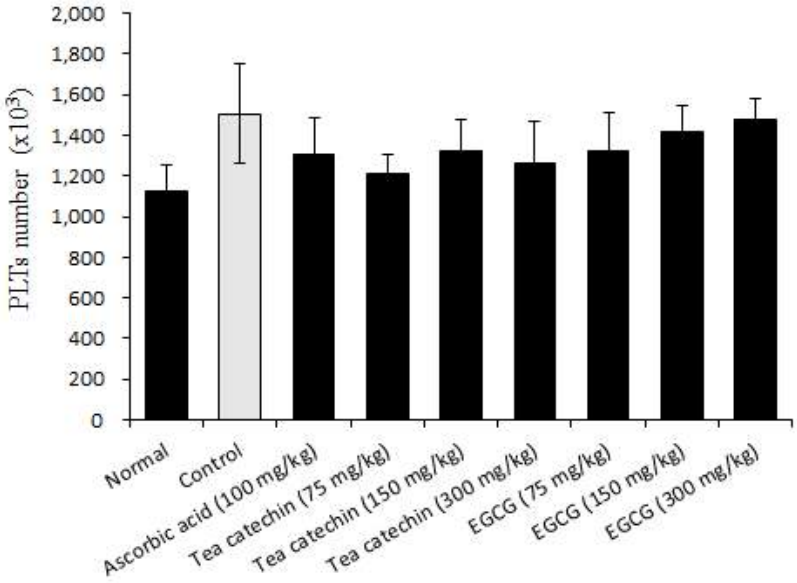


그림5. 산화스트레스 동물모델에서 고순도 EGCG가 혈액내 혈소판의 수에 미치는 영향

(4) 산화스트레스 모델에서 고순도 EGCG가 혈액내 헤모글로빈의 수에 미치는 영향

(가) AAPH에 의해 산화스트레스가 나타난 실험동물의 혈액내 헤모글로빈의 수에 고순도 EGCG가 미치는 영향을 확인하고자 실험동물의 혈액을 혈구분석기로 분석하였다.

(나) 그 결과 정상군에서는 17.0±0.3 g/dL이었으나 산화스트레스가 나타난 대조군에서 20.6±1.2 g/dL으로 증가하였다. 산화스트레스에 의해 저순도 EGCG를 포함하는 녹차추출물을 75, 150, 300 mg/kg의 농도로 투여한 실험동물의 혈액에서는 각각 19.4±0.8 g/dL, 19.2±1.2

(다) g/dL, 18.9±0.6 g/dL 으로 대조군에 비해 소폭 감소한 것으로 나타났다, 고순도 EGCG를 75, 150, 300 mg/kg의 농도로 투여한 실험동물의 혈액에서는 19.3±0.9 g/dL, 19.4±0.8 g/dL, 21.0±1.9 $\times 10^3$ g/dL의 수를 나타내어 고순도 EGCG에 의해 혈소판의 수가 약간 감소한 것으로 나타났다.

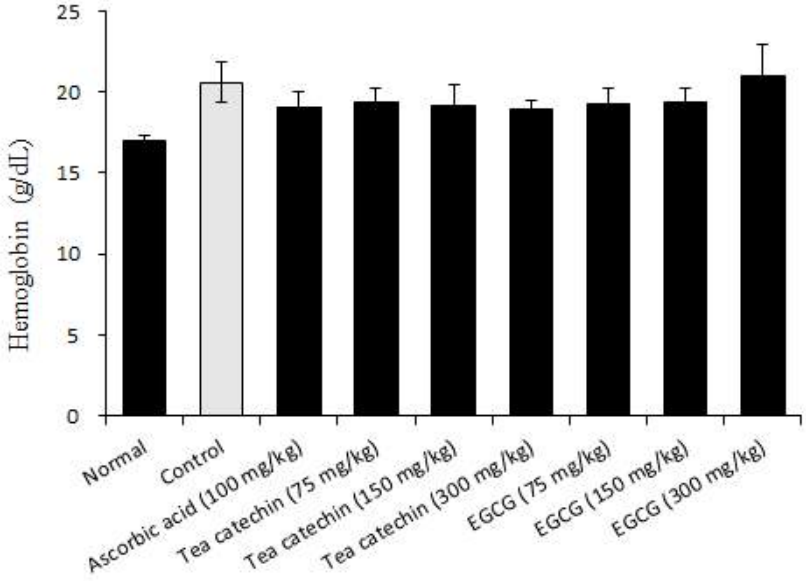


그림6. 산화스트레스 동물모델에서 고순도 EGCG가 혈액내 헤모글로빈의 양에 미치는 영향

(5) 산화스트레스 모델에서 고순도 EGCG가 혈장내 알부민의 함량에 미치는 영향

(가) 고순도 EGCG가 산화스트레스를 유발한 실험동물의 혈청내에 존재하는 생화학지표들에 미치는 영향을 알아보고자 혈액에 대한 생화학분석을 실시하였다.

(나) 그 결과 혈액내에 존재하는 알부민의 양은 정상군에서 4.08±0.26 g/dL이었으나 산화스트레스가 발생한 실험동물의 혈액에서는 2.58±0.66 g/dL로 크게 감소하였다. 반면 저순도 EGCG를 포함하는 녹차추출물을 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 혈액내 알부민 수치는 각각 4.62±0.24 g/dL, 4.22±0.52 g/dL, 4.63±0.39 g/dL 이었으며 고순도 EGCG를 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 혈액내 알부민 수치는 각각 4.72±0.33 g/dL, 4.73±0.15 g/dL, 4.33±0.38 g/dL으로 EGCG 투여군에서 그 양이 대조군에 비해 크게 증가하여 정상군과 비슷한 수준에 이르는 것이 관찰되었다.

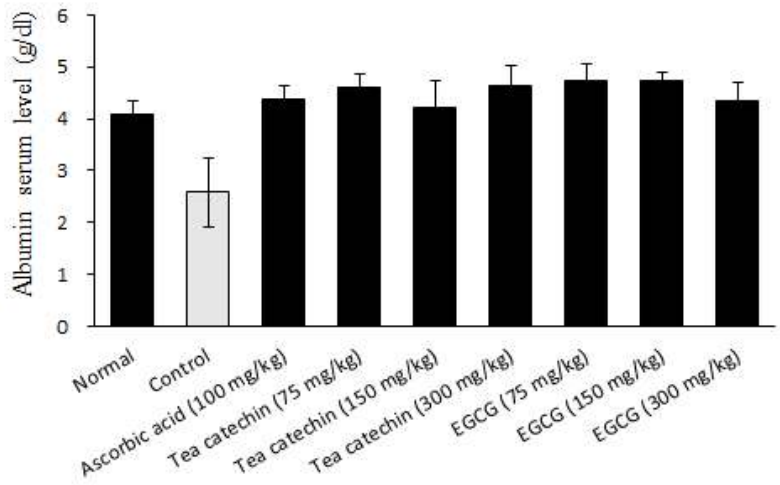


그림7. 산화스트레스 동물모델에서 고순도 EGCG가 혈액내 알부민의 양에 미치는 영향

(6) 산화스트레스 모델에서 고순도 EGCG가 혈장내 크레아틴의 함량에 미치는 영향

(가) 고순도 EGCG가 산화스트레스를 유발한 실험동물의 혈청내에 존재하는 생화학지표들에 미치는 영향을 알아보고자 혈액에 대한 생화학분석을 실시하였다.

(나) 그 결과 혈액내에 존재하는 크레아틴의 양은 정상군에서 0.49±0.09 mg/dL이었으나 산화스트레스가 발생한 실험동물의 혈액에서는 0.96±0.02 mg/dL로 크게 증가하였다. 반면 저순도 EGCG를 포함하는 녹차추출물을 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 혈액내 알부민 수치는 각각 0.82±0.18 mg/dL, 0.69±0.14 mg/dL, 0.73±0.21 mg/dL이었으며 고순도 EGCG를 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 혈액내 크레아틴 수치는 각각 0.81±0.24 mg/dL, 0.73±0.15 mg/dL, 0.79±0.07 mg/dL으로 EGCG 투여군에서 그 양이 대조군에 비해 감소하는 것으로 나타났다.

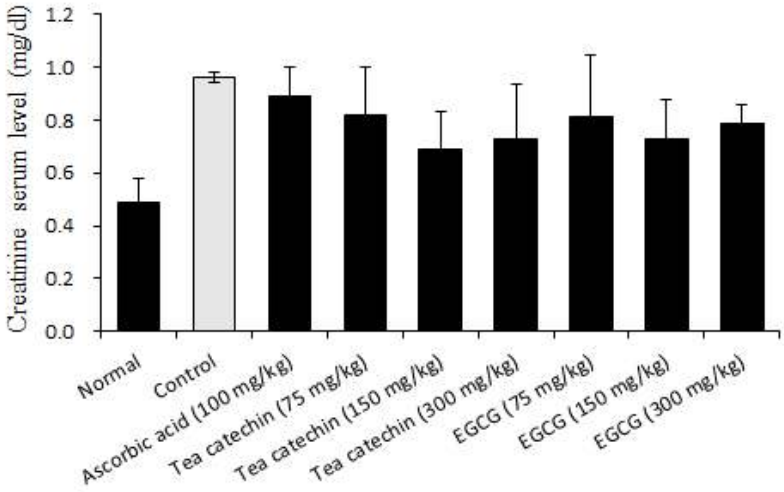


그림8. 산화스트레스 동물모델에서 고순도 EGCG가 혈액내 크레아틴의 양에 미치는 영향

(7) 산화스트레스 모델에서 고순도 EGCG가 혈장내 LDL의 함량에 미치는 영향

(가) 고순도 EGCG가 산화스트레스를 유발한 실험동물의 혈청내에 존재하는 생화학지표들에 미치는 영향을 알아보고자 혈액에 대한 생화학분석을 실시하였다.

(나) 그 결과 혈액내에 존재하는 LDL의 양은 정상군에서 14.2±1.64 mg/dL이었으나 산화스트레스가 발생한 실험동물의 혈액에서는 20.8±2.59 mg/dL로 크게 증가하였다. 반면 저순도 EGCG를 포함하는 녹차추출물을 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 혈액내 알부민 수치는 각각 12.0±2.45 mg/dL, 12.4±5.22 mg/dL, 16.0±3.16 mg/dL이었으며 고순도 EGCG를 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 혈액내 LDL 수치는 각각 17.2±4.55 mg/dL, 13.03±4.58 mg/dL, 14.33±4.04 mg/dL으로 EGCG 투여군에서 그 양이 대조군에 비해 감소하는 것으로 나타났다.

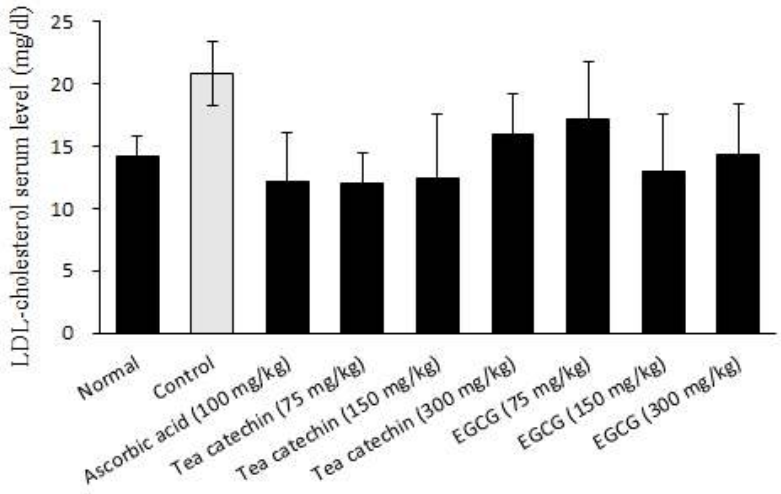


그림9. 산화스트레스 동물모델에서 고순도 EGCG가 혈액내 LDL의 양에 미치는 영향

(8) 산화스트레스 모델에서 고순도 EGCG가 혈장내 ALT의 함량에 미치는 영향

(가) 고순도 EGCG가 산화스트레스를 유발한 실험동물의 혈청내에 존재하는 생화학지표들에 미치는 영향을 알아보고자 혈액에 대한 생화학분석을 실시하였다.

(나) 그 결과 혈액내에 존재하는 ALT의 양은 정상군에서 55.8±11.1 u/l 이었으나 산화스트레스가 발생한 실험동물의 혈액에서는 110.0±33.25 u/l로 크게 증가하였다. 반면 저순도 EGCG를 포함하는 녹차추출물을 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 혈액내 알부민 수치는 각각 71.2±18.83 u/l, 58.2±23.88 u/l, 63.75±25.99 u/l이었으며 고순도 EGCG를 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 혈액내 ALT 수치는 각각 59.6±16.47 u/l, 66.0±17.44 u/l, 58.6±25.15 u/l으로 EGCG 투여군에서 그 양이 대조군에 비해 감소하는 것으로 나타났다.

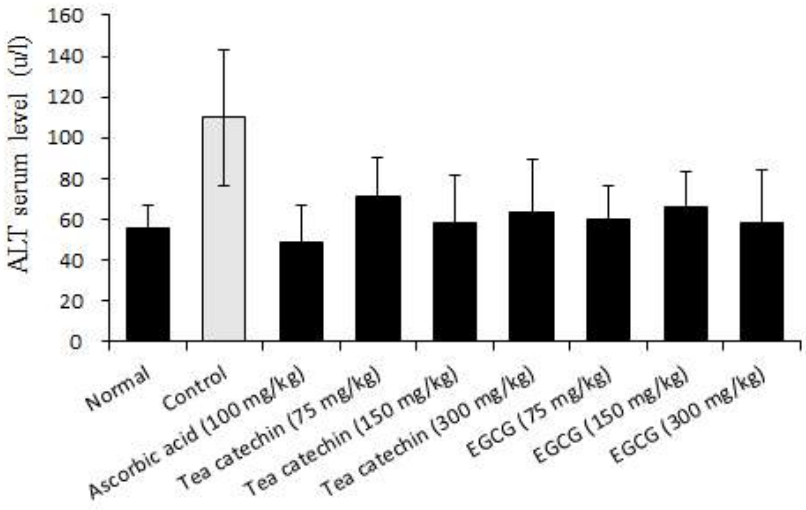


그림10. 산화스트레스 동물모델에서 고순도 EGCG가 혈액내 ALT의 양에 미치는 영향

(9) 산화스트레스 모델에서 고순도 EGCG가 혈장내 AST의 함량에 미치는 영향

(가) 고순도 EGCG가 산화스트레스를 유발한 실험동물의 혈청내에 존재하는 생화학지표들에 미치는 영향을 알아보고자 혈액에 대한 생화학분석을 실시하였다.

(나) 그 결과 혈액내에 존재하는 AST의 양은 정상군에서 162.6±16.96 u/l이었으나 산화스트레스가 발생한 실험동물의 혈액에서는 217.6±35.96 u/l로 크게 증가하였다. 반면 저순도 EGCG를 포함하는 녹차추출물을 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 혈액내 알부민 수치는 각각 169.6±13.76 u/l, 178.8±43.10 u/l, 182.8±48.11 u/l이었으며 고순도 EGCG를 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 혈액내 ALT 수치는 각각 159.0±21.60 u/l, 118.7±24.13 u/l, 104.3±33.62 u/l으로 EGCG 투여군에서 그 양이 대조군에 비해 농도의존적으로 감소하는 것으로 나타났다.

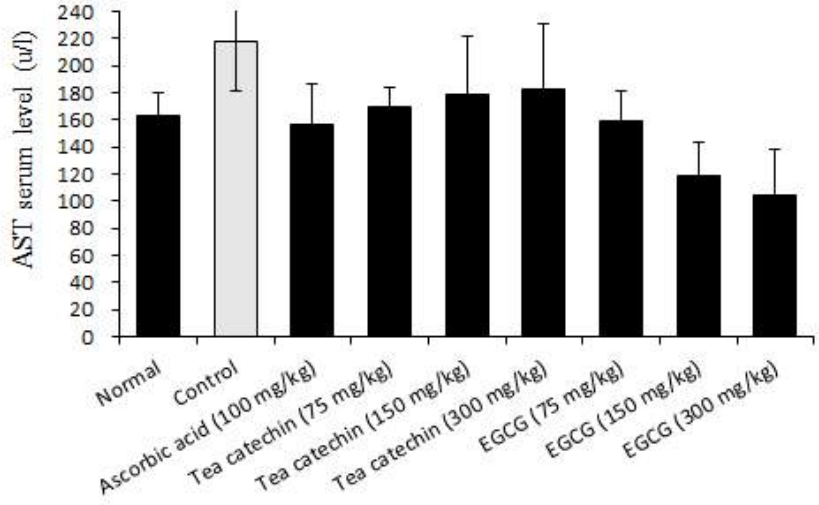


그림11. 산화스트레스 동물모델에서 고순도 EGCG가 혈액내 AST의 양에 미치는 영향

(10) 고순도 EGCG가 산화스트레스가 유발된 실험동물의 간세포에서 catalase의 활성에 미치는 영향 분석

(가) 치사된 실험동물의 간 조직 일부를 적출한 후 Bansal 등의 방법)에 의해 4배의 150 mM의 KCl을 가하여 homogeniger를 이용하여 균질화 하였다. 균질화 한 조직을 1차 원심분리(1,000 rpm 20분)한 후 균질화 되지 않은 조직 등을 제거하고 2차 원심분리 (4,000 rpm 30분)하여 상등액을 취하여 간분획물을 얻었다, Catalase 활성도 측정은 Abei의 방법)에 따라 3.0 mL cuvette에 130 nm phosphate buffer (pH 7,0) 500 ㎕, 간 분획물 40 ㎕와 증류수 660 ㎕를 혼합하여 기질인 15mM H_2O_2 농도에 의한 흡광도의 감소율을 측정하였다. 효소의 활성도는 1분 동안 1 μM의 H_2O_2를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 표시하였다.

(나) 그 결과 간에 존재하는 catalase의 활성은 정상군에서 82.20±8.55 nmol/min/ml이었으나 산화스트레스가 발생한 실험동물의 간에서는 51.05±5.91 nmol/min/ml로 크게 감소하였다. 반면 저순도 EGCG를 포함하는 녹차추출물을 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 catalase 활성도는 각각 76.96±11.36 nmol/min/ml, 69.58±5.23 nmol/min/ml, 64.58±7.96 nmol/min/ml이었으며 고순도 EGCG를 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 catalase 활성도는 각각 65.72±2.07 nmol/min/ml, 81.06±4.23 nmol/min/ml,

80.70±15.25 nmol/min/ml으로 EGCG 투여군에서 그 양이 대조군에 비해 농도의존적으로 증가하는 것으로 나타났다.

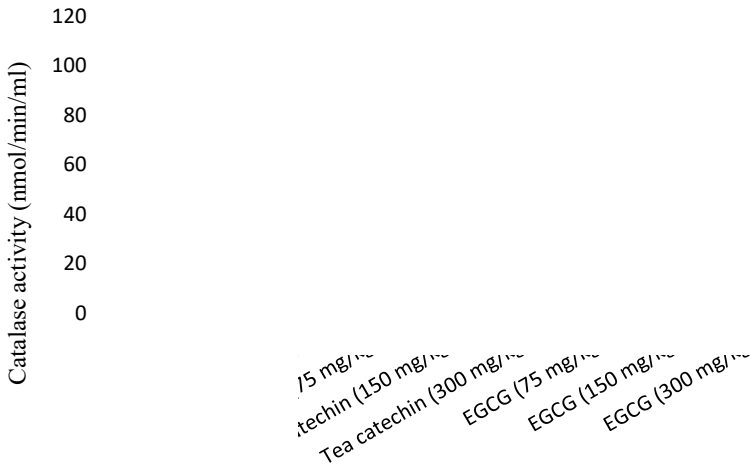


그림12. 산화스트레스 동물모델에서 고순도 EGCG가 간에서 catalase의 활성에 미치는 영향

(11) 고순도 EGCG가 산화스트레스가 유발된 실험동물의 간세포에서 SOD의 활성에 미치는 영향 분석

(가) 치사된 실험동물의 간 조직 일부를 적출한 후 Bansal 등의 방법)에 의해 4배의 150 mM의 KCl을 가하여 homogeniger를 이용하여 균질화 하였다. 균질화 한 조직을 1차 원심분리(1,000 rpm 20분)한 후 균질화 되지 않은 조직 등을 제거하고 2차 원심분리 (4,000 rpm 30분)한 뒤 나머지는 3차 원심분리(20,000 rpm 1시간) 후 상등액을 취하여 간분획물을 얻고 SOD의 활성을 측정하였다.

(나) 그 결과 간에 존재하는 SOD의 활성은 정상군에서 2.90±2.91 nmol/min/ml이었으나 산화스트레스가 발생한 실험동물의 간에서는 0.15±0.10 nmol/min/ml로 크게 감소하였다. 반면 저순도 EGCG를 포함하는 녹차추출물을 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 간에 존재하는 SOD의 활성은 각각 8.04±0.60 nmol/min/ml, 11.65±1.23 nmol/min/ml, 16.98±7.60 nmol/min/ml이었으며 고순도 EGCG를 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 SOD 활성도는 각각 4.06±4.09 nmol/min/ml, 7.90±3.75 nmol/min/ml, 14.89±6.59 nmol/min/ml으로 EGCG 투여군에서 그 양이 대조군에 비해 농도의존적으로 증가하는 것으로 나타났다.

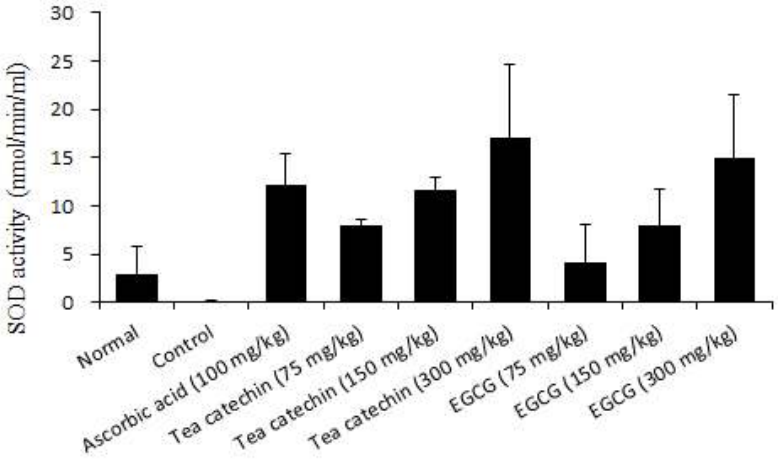


그림13. 산화스트레스 동물모델에서 고순도 EGCG가 간에서 SOD의 활성에 미치는 영향

(12) 고순도 EGCG가 산화스트레스가 유발된 실험동물의 간세포에서 GSH에 미치는 영향 분석

(가) 간에서의 GSH-px 활성을 측정하기 위하여 간조직 100 mg을 0.5 ml의 GST assay buffer에 넣고 homogenizer로 균질화 한 뒤 10,000 xg, 4℃, 15분 동안 원심분리하여 그 상등액을 사용하였다. 시료는 총 50 μl준비하고 GST assay buffer로 비율을 조정하여 사용하였다. 음성대조군으로는 GST buffer를 50 μl 사용하였다. 저순도와 고순도 EGCG를 처리한 그룹 및 대조군은 모두 glutathione 5 μl를 더하여 사용하였다. GST assay buffer와 GST substrate (CDNB) solution을 49:1의 비율로 혼합하여 EGCG처리군과 대조군에 각각 50 μl를 분주한 뒤 340 nm의 파장에서 1분 간격으로 적어도 5번 흡광도를 측정하여 GSH의 양을 측정하였다.

(나) 그 결과 간에 존재하는 glutathione의 양은 정상군에서 3.02±0.84 μM이었으나 산화스트레스가 발생한 실험동물에서는 1.05±0.74 μM로 크게 감소하였다. 반면 저순도 EGCG를 포함하는 녹차추출물을 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 glutathione의 양은 각각 2.61±0.72 μM, 3.47±1.24 μM, 1.93±0.62 μM이었으며 고순도 EGCG를 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 간조직내 glutathione의 양은 각각 2.48±0.65 μM, 2.35±0.20 μM, 3.36±1.16 μM으로 EGCG 투여군에서 그 양이 대조군에 비해 농도의존적으로 증가하는 것으로 나타났다.

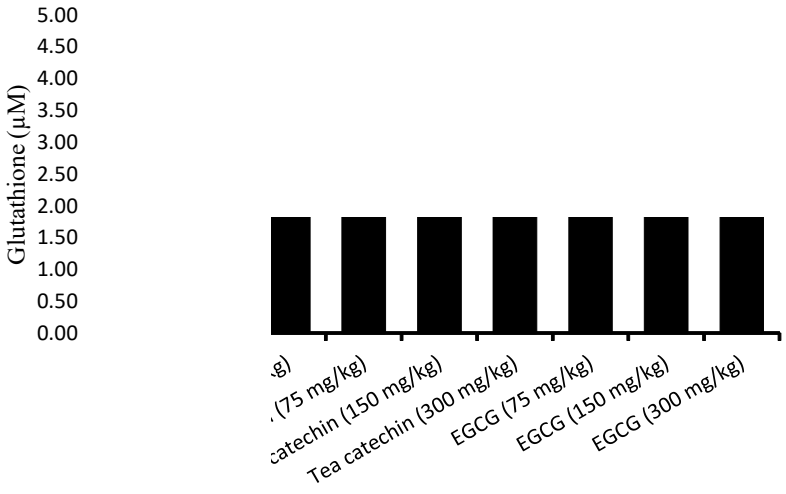


그림14. 산화스트레스 동물모델에서 고순도 EGCG가 간에서 GSH의 양에 미치는 영향

(13) 고순도 EGCG가 산화스트레스가 유발된 실험동물의 간세포에서 nitric oxide의 생성에 미치는 영향 분석

(가) 간에서의 NO 생성을 측정하기 위하여 치사된 실험동물의 간 조직 일부를 적출한 후 Bansal 등의 방법)에 의해 4배의 150 mM의 KCl을 가하여 homogeniger를 이용하여 균질화 하였다. 균질화 한 조직을 1차 원심분리(1,000 rpm 20분)한 후 균질화 되지 않은 조직 등을 제거하고 2차 원심분리 (4,000 rpm 30분)하여 상등액을 취하여 간추출물을 확보하였다.

(나) 간조직에서 존재하는 nitric oxide의 양은 Nitric Oxide assay kit (Dojindo, Japan)을 이용하여 측정하였고, 450 nm에서 흡광도를 측정한 후 NO의 함량을 계산하였다.

(다) 그 결과 간에 존재하는 NO의 양은 정상군에서 2621±368 μM이었으나 산화스트레스가 발생한 실험동물에서는 3952±956 μM로 크게 증가하였다. 반면 저순도 EGCG를 포함하는 녹차추출물을 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 NO 수치는 각각 2750±1032 μM, 2005±756 μM, 2547±423 μM이었으며 고순도 EGCG를 75, 150, 300 mg/kg로 투여한 실험동물의 NO 양은 각각 2233±564 μM, 2317±423 μM, 1908±284 μM으로 EGCG 투여군에서 그 양이 대조군에 비해 농도의존적으로 감소하는 것으로 나타났다.

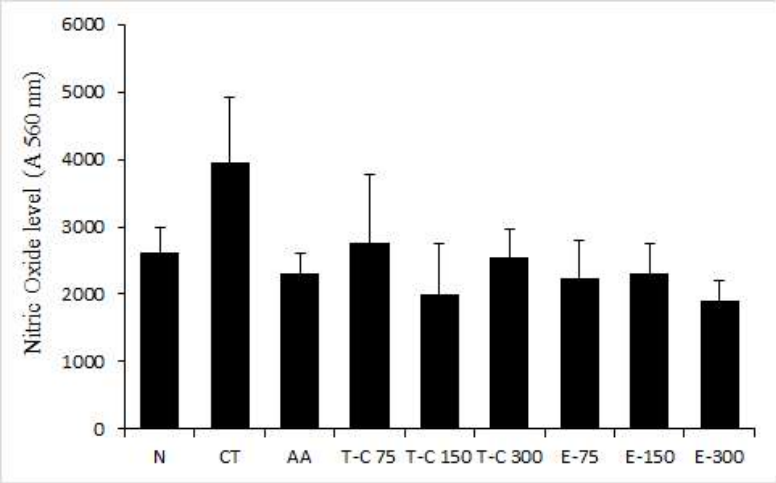


그림15. 산화스트레스 동물모델에서 고순도 EGCG가 간에서 NO의 양에 미치는 영향

(라) 현재의 결과를 종합하면 녹차추출물은 항산화 효능을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 고순도 EGCG는 유효한 항산화 효능을 가지고 있어서 항노화 효능을 가질 것으로 예상된다.

3. 당뇨동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG의 항당뇨 효능 평가

가. 연구방법

(1) 실험동물

실험동물은 대한바이오링크 (Eum-seong, Korea)에서 3주령 수컷 db/db 마우스 (BKS.Cg-m+/+ Lepr db/J)를 분양받아 사용하였다. 동물 사육실 환경은 12시간씩 밤낮 주기로 이루어졌으며, 약 23±1 ℃의 온도를 유지하도록 하였다. 실험동물은 사료와 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 본 연구의 동물 실험에 관한 모든 사항 및 절차는 대전대학교 동물실험 윤리위원회의 승인 (DJUARB2018-001)을 받은 후 진행하였다.

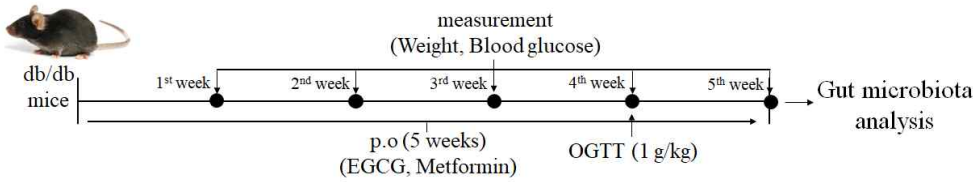


그림16. 당뇨동물모델 동물실험에 대한 개요

(2) 약물투여

3주령의 수컷 db/db 마우스를 구입하여 동물 사육실 환경에서 적응시킨 후 4주령이 되었을 때 고순도 EGCG를 10, 50, 100 mg/kg의 용량으로 경구 투여 하였고, 양성 대조군으로는 metformin (Sigma Aldrich, USA) 150 mg/kg을 사용하였다. 투여는 실험 시작일을 기준으로 5주 동안 매일 오전 10시에 100 μl 씩 투여하였다.

(3) 체중 측정 및 식이섭취량

마우스의 체중을 측정하여 최초 몸무게로부터 변화율을 비교 관찰하였다. 체중 측정을 시간에 따른 식이 섭취에 의한 영향을 최소화 하고자 약물을 투여하기 직전 주 1회 같은 시간에 측정하였다. 식이 측정은 최초 동일한 양의 식이 (Teklad global 18% protein rodent diets, ENVIGO, UK)를 공급하였으며 실험 종료일에 회수하여 무게를 측정한 뒤 평균으로 계산하였다. 체중 및 식이 측정은 생쥐용 전자저울 (Max 2000g, Min 2g, e=1g, d=0.1g, CAS, Korea)을 사용하였다.

(4) 혈당 측정

실험시작 후 주 1회 마우스의 혈당을 측정하였다. 혈당은 오전 9시에 식이를 제거하여 절식한 뒤 공복 6시간 후 마우스의 꼬리 미정맥에서 휴대용 혈당계 (OneTouch Select Plus® Blood Glucose Meter, Johnson & Johnson, USA)를 시용하여 측정하였다.

(5) Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

내당능을 평가하기 위해, 실험 시작일을 기준으로 4주째에 마우스를 6시간 절식시킨 후 포도당 (Sigma Aldrich, USA) 용액을 투여하였다(1 g/kg of body weight). 포도당 투여 전인 공복혈당과 포도당 투여 후

30, 60, 120 분에 꼬리 미정맥에서 혈액을 채취하고 휴대용 혈당계를 이용하여 혈당을 측정하였다.

(6) Plasma 분리

실험 종료 후 실험동물을 마취시킨 후 심장에서 혈액을 채취해 혈청 분리용 튜브에 담았다. 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청은 -70℃에서 냉동보관한 후에 생화학적 지표 분석에 사용되었다.

(7) 대변에서 bacterial DNA 추출

실험 종료 후 실험동물을 치사시킨 후 대장으로부터 변을 채취하여 DNA를 추출하였다. 대변 DNA는 FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA)를 이용하여 제품 제조사의 매뉴얼에 따라 다음과 같이 추출하였다. Lysing Matrix E tube에 대변을 옮긴 후 sodium phosphate buffer 978 µl 와 MT buffer 122 µl를 넣고 vortex를 사용하여 잘 섞이도록 교반해주었다. 이후 14,000xg에서 15분간 원심분리 한 뒤 상등액을 새로운 튜브로 옮겨준 다음 PPS 250 978 µl 첨가하여 튜브를 위아래 뒤집는 과정을 10회 반복하였다. 14,000xg에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 새로운 15 ml 튜브로 옮긴 후 잘 섞어준 Binding Matrix를 1 ml 넣어주었다. 로테이터에 2분간 둠으로써 DNA가 matrix에 binding하게 해준 뒤, silica matrix가 가라앉도록 3분간 방치하였다. 가라앉은 binding matrix는 건드리지 않도록 주의하며 상등액 500 µl를 제거하였다. 튜브에 남은 binding matrix와 상등액을 잘 섞어준 뒤 mixture 600 µl를 따서 SPIN™ Filter로 옮겨준 후 14,000xg에서 1분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 catch tube를 비워준 후 남은 mixture를 다시 SPIN™ Filter로 옮겨준 후 동일한 과정을 반복해준다. SEWS-M wash solution 500 µl를 가하여 pellet를 잘 섞이게 해준 뒤 14,000xg에서 1분간 원심분리 한 후, catch tube를 비워주었다. 남은 wash solution를 완전히 제거하기 위해 14,000xg에서 2분간 원심분리 한 뒤 새로운 catch tube를 장착하였다. 실온에서 5분간 건조시킨 후에 DES solution 50 µl를 첨가하여 14,000xg에서 1분간 원심분리 하였다. 원심분리 후에 SPIN™ Filter는 버리고 elution된 DNA 용액을 얻었다. 추출된 DNA는 미생물 군집 분

석 (Microbiome Taxonomic Profile)에 사용되었다.

(8) 장내미생물 분석

고순도 EGCG를 50 mg/kg로 투여한 실험동물의 분변에서 분리한 DNA와 당뇨가 유발된 대조군 실험동물의 분변에서 분리된 DNA에 존재하는 장내미생물을 확인하고자 장내미생물 분석 전문업체인 ㈜천랩에 장내미생물의 검출을 의뢰하였다.

이후 장내미생물에 대한 데이터분석은 BioiPlug 홈페이지를 이용하여 해당 어플리케이션을 활용하여 분석하였다.

나. 연구 결과

(1) 고순도 EGCG가 db/db 생쥐의 일일체중증가량, 사료 섭취량 및 식이효율에 미치는 영향

4주간 약물 투여를 진행하는 동안 대조군 및 EGCG 투여군 모두에서 유의할만한 일일체중 변화는 관찰되지 않았음. 또한 실험 종료 시 EGCG 투여군의 하루 사료섭취량은 대조군에 비하여 유의적인 차이를 나타내지 않음. 사료 섭취량과 일일체중증가량을 이용하여 각 군의 5주간 식이효율을 구해보았을 때, EGCG 100 mg/kg 투여군은 대조군(NC)에 비하여 식이효율 (FBR, %)이 감소되었지만 유의적이지 않았음.

표1 당뇨가 유발된 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 미치는 일일체중변화량 및 식이섭취량 변화

Group	Food intakes (g/day)	Body weight gain (g/day)	Food efficiency ratio (FER, %)
Negative Control	5.90	0.5±1.66	15.66 ± 1.04
EGCG 300 mg/kg	5.36	0.36±3.47	15.31 ± 3.22
EGCG 200 mg/kg	5.26	0.35±3.04	15.25 ± 3.12
EGCG 100 mg/kg	5.42	0.30±1.75	13.02 ± 3.01
Metformin 150 mg/kg	6.23	0.44±1.16	13.91 ± 1.08

(2) 고순도 EGCG가 db/db 생쥐의 체중에 미치는 영향

4주간의 약물 투여가 진행되는 동안 주 1회 생쥐의 체중을 측정하였음. EGCG를 투여한 db/db 생쥐는 실험 시작 후 2주차부터 대조군에 비해 체중의 감소가 나타났으며, EGCG 200 mg/kg 투여군은 2주차부터 실험 종료 때까지 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 체중이 감소하였음.

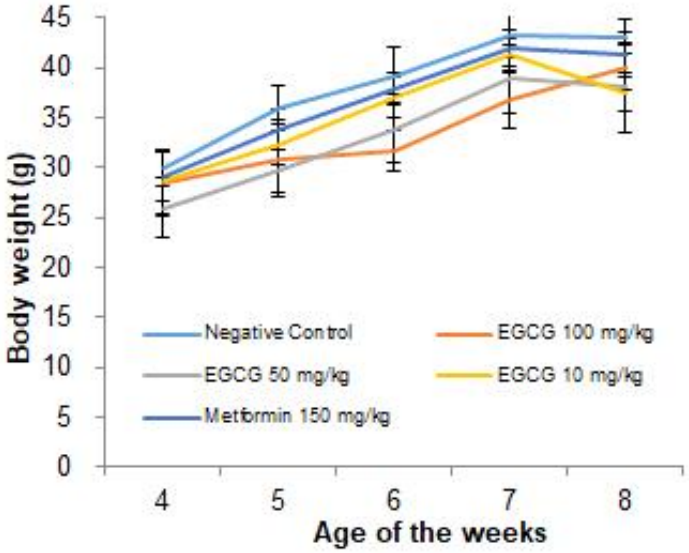


그림17. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 체중에 미치는 영향.

(3) 고순도 EGCG가 db/db 생쥐의 혈당 변화에 미치는 영향

(가) 4주간의 약물 투여를 진행하는 동안 주 1회 휴대용 혈당 측정기로 생쥐의 꼬리에서 혈액을 채혈하여 혈당을 측정하였음. 공복혈당을 측정하기 위하여 혈당 측정 6시간 전에 생쥐의 식이를 제거하였음. 그 결과 대조군(NC)의 혈당은 4주령 205.3 mg/dl, 6주령 471.8 mg/dl, 8주령 516 mg/dl로 지속적으로 증가한 반면 EGCG 100 mg/kg 투여군과 EGCG 200 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 통계학적으로 유의성 있게 혈당 감소효과를 나타냄.

(나) 5주령에서 EGCG 200 mg/kg 투여군의 혈당은 258.6 mg/dl, EGCG 100 mg/kg 투여군은 268.5 mg/dl로, 대조군에 비하여 각각 27.6%, 24.9% 감소하였음.

(다) 6주령에서 EGCG 300 mg/kg 투여군은 329.2 mg/dl, EGCG 200 mg/kg 투여군은 291.8 mg/dl, EGCG 100 mg/kg 투여군은 313.3 mg/dl로서 대조군에 비하여 각각 30.2%, 38.1%, 33.6%의 감소효과를

나타냄.

(라) 더욱이 양성대조군으로 사용된 metformin에 비해 고순도 EGCG의 혈당강하 효능이 더 우수한 것으로 여겨짐.

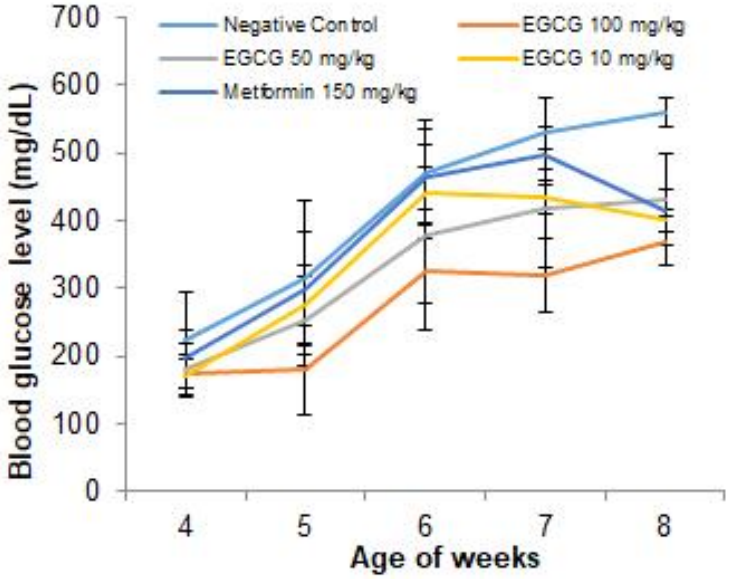


그림18. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 혈당에 미치는 영향.

(4) 고순도 EGCG가 db/db 생쥐의 경구 당부하(OGTT)에 미치는 영향

(가) 고순도 EGCG의 투여가 db/db 생쥐의 경구 당부하시 미치는 영향을 알아보고자 OGTT를 시행함. 실험동물에 포도당을 투여한 후 30분 간격으로 생쥐의 꼬리에서 혈액을 채혈하여 혈당농도를 측정하였음.

(나) 포도당 투여 이전에 고순도 EGCG를 경구투여한 실험동물의 혈액에 존재하는 당의 농도가 대조군에 비해 낮은 상태였음. 대조군에서 포도당 투여 후 30분에 혈당이 최고조에 도달하고 서서히 혈당이 감소하는 것이 나타났음. EGCG를 투여한 실험동물에서도 30분에 혈당의 농도가 가장 높았으나 이후 100, 200, 300 mg/kg 모두 대조군에 비해 혈당을 농도의존적으로 상당히 낮추는 것이 관찰되었음. 양성대조군으로 사용된 metformin 투여군도 OGTT가 유의적으로 나타났으나 200 또는 300 mg/kg의 고순도 EGCG에 비해서는 그 정도가 약하였음.

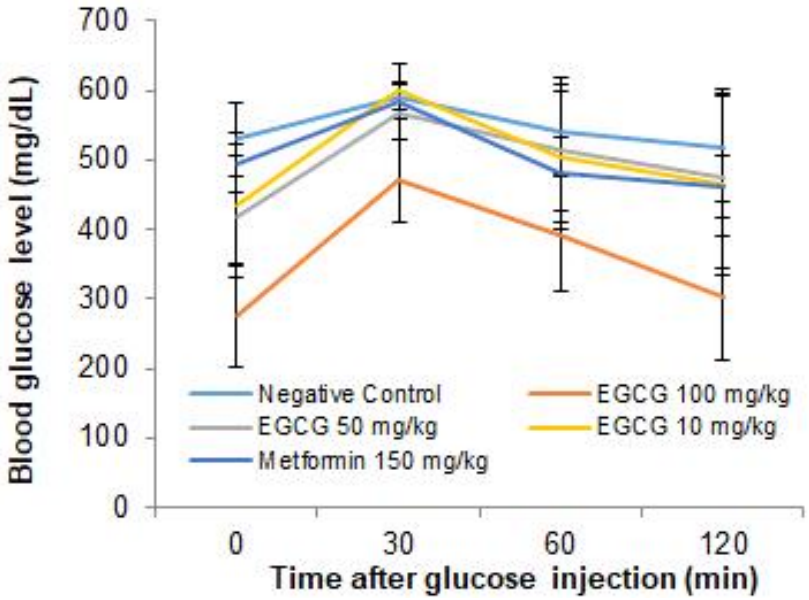


그림19. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 OGTT에 미치는 영향.

(5) 고순도 EGCG가 db/db 생쥐에서 혈액의 생화학적 수치에 미치는 영향

(가) 고순도 EGCG를 당뇨가 유발된 db/db 실험동물에게 4주간 경구로 투여한 뒤 혈액내에 존재하는 총콜레스테롤의 양을 분석하기 위하여 치사된 실험동물의 혈액에서 혈청을 분리하고 이를 생화학 분석기로 분석하였다.

(나) 그 결과 대조군에서는 250±18 mmol/L이었을 때 고순도 EGCG를 10, 50, 100 mg/kg의 농도로 경구투여한 실험동물의 혈액에 존재하는 총콜레스테롤의 양은 각각 177±11 mmol/L, 166±14 mmol/L, 157±9 mmol/L 으로 나타나 대조군에 비해 농도의존적으로 총 콜레스테롤의 양이 감소하는 것이 나타났다. 양성대조군으로 사용한 메트포민 투여군은 167±16 mmol/L으로 나타났다.

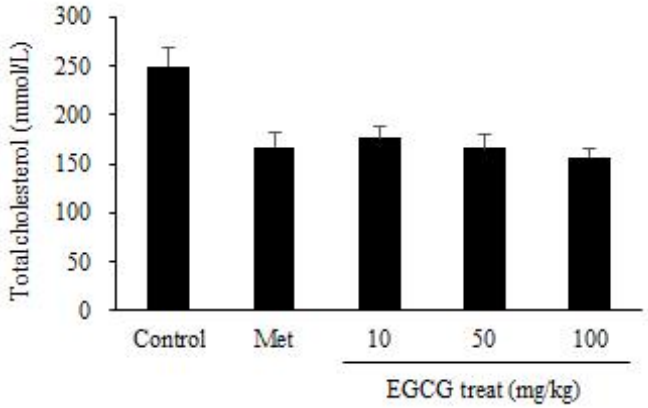


그림20. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 혈액 내 총콜레스테롤에 미치는 영향.

(6) 고순도 EGCG가 db/db 생쥐에서 혈액의 생화학적 수치에 미치는 영향

(가) 고순도 EGCG를 당뇨가 유발된 db/db 실험동물에게 4주간 경구로 투여한 뒤 혈액내에 존재하는 HDL의 양을 분석하기 위하여 치사된 실험동물의 혈액에서 혈청을 분리하고 이를 생화학 분석기로 분석하였다.

(나) 그 결과 대조군에서는 106±14 mg/dL이었을 때 고순도 EGCG를 10, 50, 100 mg/kg의 농도로 경구투여한 실험동물의 혈액에 존재하는 HDL의 양은 각각 87±7 mg/dL, 95±5 mg/dL, 76±12 mg/dL 으로 나타나 대조군에 비해 HDL의 양이 감소하는 것이 나타났다. 양성대조군으로 사용한 메트포민 투여군은 80±33 mg/dL으로 나타났다.

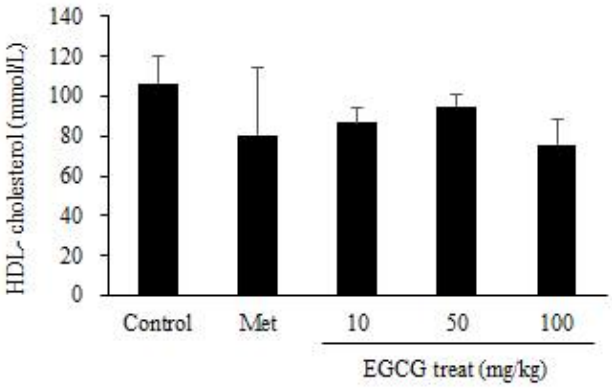


그림21. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 혈액 내 HDL의 양에 미치는 영향.

(7) 고순도 EGCG가 db/db 생쥐에서 혈액의 생화학적 수치에 미치는 영향

(가) 고순도 EGCG를 당뇨가 유발된 db/db 실험동물에게 4주간 경구로 투여한 뒤 혈액내에 존재하는 LDL의 양을 분석하기 위하여 치사된 실험동물의 혈액에서 혈청을 분리하고 이를 생화학 분석기로 분석하였다.

(나) 그 결과 대조군에서는 27±3 mg/dL이었을 때 고순도 EGCG를 10, 50, 100 mg/kg의 농도로 경구투여한 실험동물의 혈액에 존재하는 LDL의 양은 각각 17±2 mg/dL, 16±5 mg/dL, 14±1 mg/dL 으로 나타나 대조군에 비해 LDL의 양이 고순도 EGCG에 의해 농도의존적으로 감소하는 것이 나타났다. 양성대조군으로 사용한 메트포민 투여군은 15±1 mg/dL으로 나타났다.

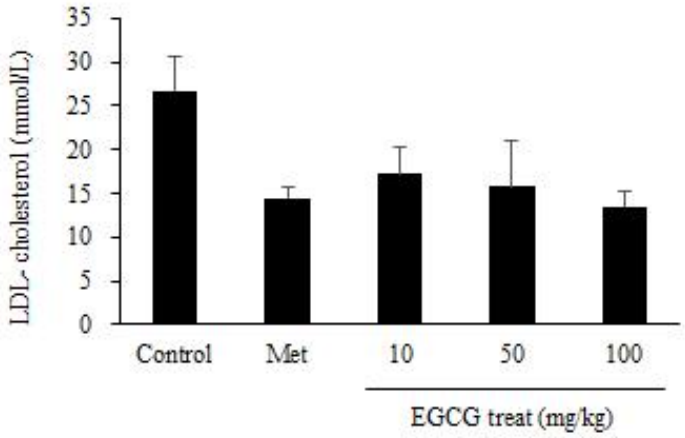


그림22. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 혈액 내 LDL의 양에 미치는 영향.

(8) 고순도 EGCG가 db/db 생쥐에서 혈액의 생화학적 수치에 미치는 영향

(가) 고순도 EGCG를 당뇨가 유발된 db/db 실험동물에게 4주간 경구로 투여한 뒤 혈액내에 존재하는 HDL/LDL의 비율을 분석하기 위하여 치사된 실험동물의 혈액에서 혈청을 분리하고 이를 생화학 분석기로 분석한 HDL과 LDL의 상대적인 농도를 계산하였다.

(나) 그 결과 대조군에서는 4.28±0.72 이었을 때 고순도 EGCG를 10, 50, 100 mg/kg의 농도로 경구투여한 실험동물의 혈액에 존재하는 HDL/LDL의 비율은 각각 5.09±0.56, 5.67±0.79, 5.46±0.18으로 나타나 대조군에 비해 HDL/LDL의 비율이 고순도 EGCG에 의해 농도의존적으로 증가하는 것이 나타났다. 양성대조군으로 사용한 메트포민 투여군은 4.31±1.18으로 나타났다.

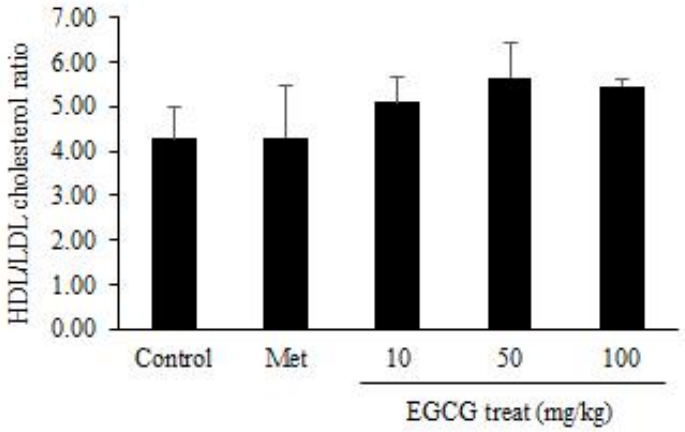


그림23. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 혈액 내 HDL/LDL의 비율에 미치는 영향.

(9) 항당뇨효능을 나타내는 고순도 EGCG가 실험동물의 장내미생물에 미치는 영향분석

(가) 실험 종료 후 실험동물을 치사시킨 후 대장으로부터 변을 채취하여 FastDNA™ SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA)를 이용하여 제품 제조사의 매뉴얼에 따라 분변에 존재하는 세균들의 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 미생물 군집 분석 (Microbiome Taxonomic Profile)에 사용되었다.

(나) 고순도 EGCG를 50 mg/kg로 투여한 실험동물의 분변에서 분리한 DNA와 당뇨가 유발된 대조군 실험동물의 분변에서 분리된 DNA에 존재하는 장내미생물을 확인하고자 장내미생물 분석 전문업체인 ㈜천랩에 장내미생물의 검출을 의뢰하였다. 이후 장내미생물에 대한 데이터분석은 BioiPlug 홈페이지를 이용하여 해당 어플리케이션을 활용하여 분석하였다.

(다) 고순도 EGCG가 장내미생물의 변화에 미치는 영향을 확인하고자 phylum의 수준에서 장내미생물의 분포를 살펴보았다. 그 결과 고순도 EGCG를 투여한 실험동물의 분변에 존재하는 Proteobacteria의 비율이 대조군에 비해 현격히 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 Firmicutes의 비율이 고순도 EGCG를 투여한 그룹에서 크게 증가하는 것으로 나타났다. 또한 고순도 EGCG는 장내미생물 중에서 Bacteriodetes의 비율도 감소시키는 것으로 보여졌다.

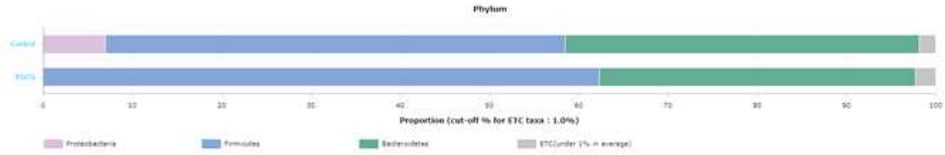


그림24. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 분변 내 박테리아의 abundance에 미치는 영향.

(라) 고순도 EGCG의 투여가 장내미생물의 균총에 변화를 주었는지 확인하기 위해 unweighted UniFrac-based principal coordinates analysis를 실시하였다.

(마) 그 결과 고순도 EGCG를 투여한 그룹은 대조군과 유의적인 장내세균 균총의 종류와 분포에 있어서 서로 차이를 나타내고 있음이 관찰되었다.

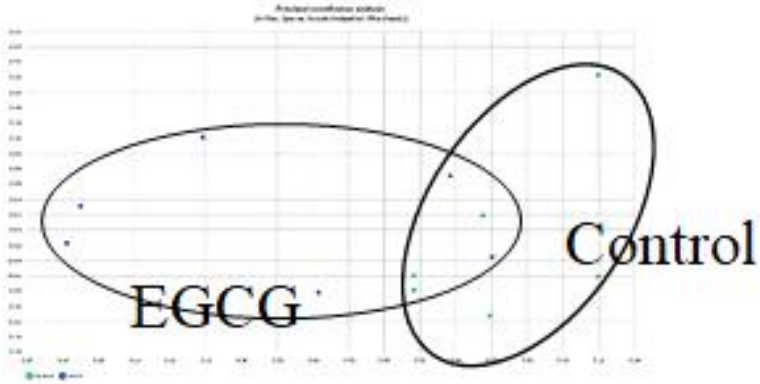


그림25. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 분변 내 박테리아의 균총에 미치는 영향.

(바) 고순도 EGCG의 투여가 장내미생물의 균총에 변화를 주었는지 확인하기 위해 unweighted pair-group mthod with arithmetic mean (UPGMA) dendrogram 분석을 실시하였다.

(사) 그 결과 고순도 EGCG를 투여한 그룹중 일부는 대조군과 같은 그룹으로 분리되고 대조군의 1 군은 EGCG 투여군과 미생물 균총이 비슷한 것으로 나타났으나 대부분의 그룹은 대조군과 고순도 EGCG 투여군으로 구분되어 있는 것으로 나타나 장내세균 균총의 종류와 분포에 있어서 고순도 EGCG가 영향을 주었음을 확인할 수 있었다.

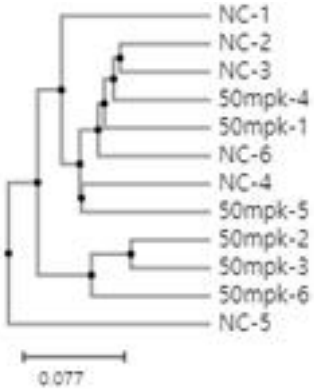


그림26. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 분변 내 박테리아의 분포에 대한 unweighted pair-group method with arithmetic mean (UPGMA) dendrogram 분석.

(아) 또한 comparison of Shannon's index.와 phylogenetic diversity 분석을 실시하여 대조군과 고순도 EGCG에 의한 장내미생물 균총에서 diversity의 차이를 분석한 결과 고순도 EGCG가 투여된 실험동물의 장내미생물은 대조군의 장내미생물 균총에서 diversity의 변화가 나타난 것을 확인할 수 있었다.

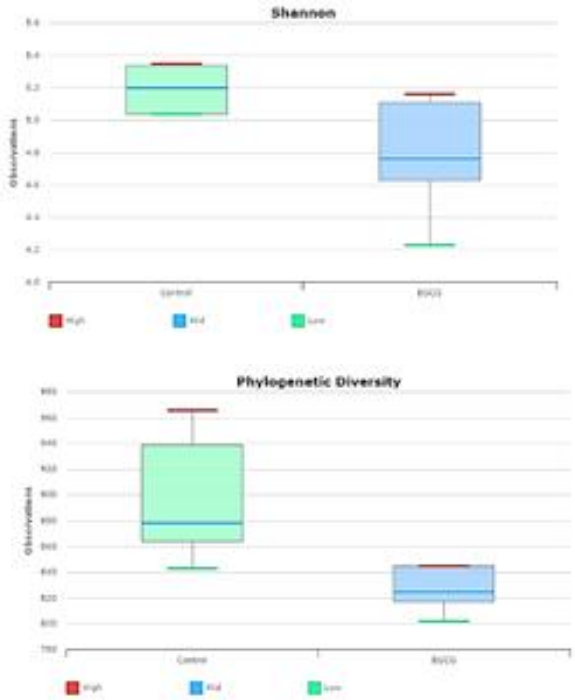


그림27. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 분변 내 박테리아의 다양성 분석. (좌)Comparison of the Shannon's index, (우) Phylogenetic Diversity.

(자) 고순도 EGCG가 장내미생물의 변화를 나타낸 것을 속 (genus)수준에서 분석을 실시하였다.

그 결과 EGCG를 투여한 실험동물에서 Lactobacillus의 균속이 가장 많이 증가한 것으로 나타나 장내 환경중에서 유산균의 비율이 상당히 증가한 것을 확인할 수 있었다. 반면 대장균 균속인 Escherichia의 비율은 고순도 EGCG에 의해 줄어들었다.

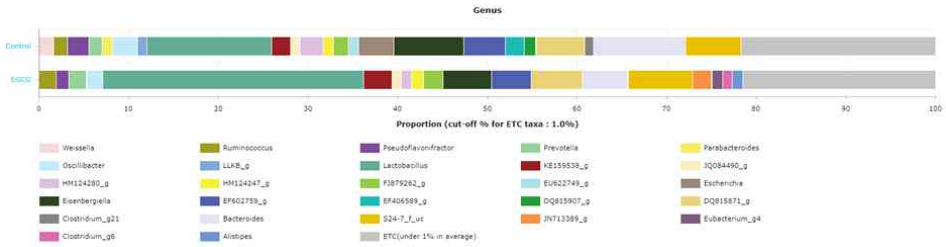


그림28. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 분변 내 박테리아의 genus 수준에서 나타내는 박테리아 균속 변화

(차) 고순도 EGCG가 장내미생물의 변화를 나타낸 것을 종 (species)수준에서 분석을 실시하였다.

그 결과 균속수준에서 비슷한 결과로 나타나 EGCG를 투여한 실험동물에서 Lactobacillus intestinalis, Lactobacillus gasseri 가 현격하게 증가하였다. 반면 Escherichia coli의 균종은고순도 EGCG에 의해 줄어들었다.

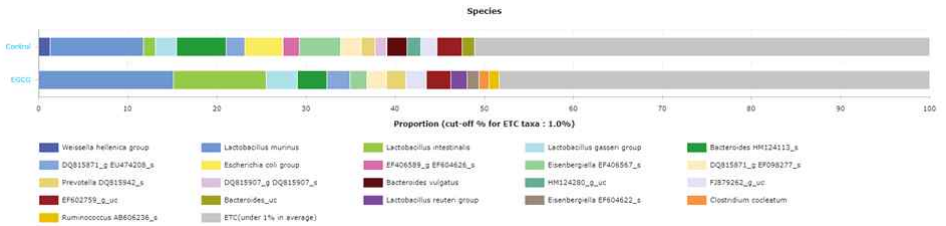


그림29. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 분변 내 박테리아의 species 수준에서 나타내는 박테리아 균종 변화

(카) 고순도 EGCG가 장내미생물 phylum 중 Firmicutes와 Bacteroidetes의 abundance와 상대적 함량비율에 미치는 영향을 분석하였다.

Firmicutes와 Bacteroidetes의 상대적 비율이 당뇨 또는 비만에 영향

을 준다는 기존의 연구에 비추어 고순도 EGCG가 이들 균문(phylum)에 영향을 주는 지 확인하고자 각각의 abundance를 비교하였다.

(타) 고순도 EGCG를 투여한 실험동물의 장내미생물은 bacteroidetes의 abundance는 감소하는 것으로 나타났다 (A). 반면 Firmicutes는 고순도 EGCG에 의하여 그 양이 증가하는 것으로 나타났다(B). 이에 두 bacteria phylum의 비율인 Firmicutes/Bacteroidetes의 비율은 대조군보다 EGCG를 투여한 실험동물에서 증가하는 것으로 나타났다.

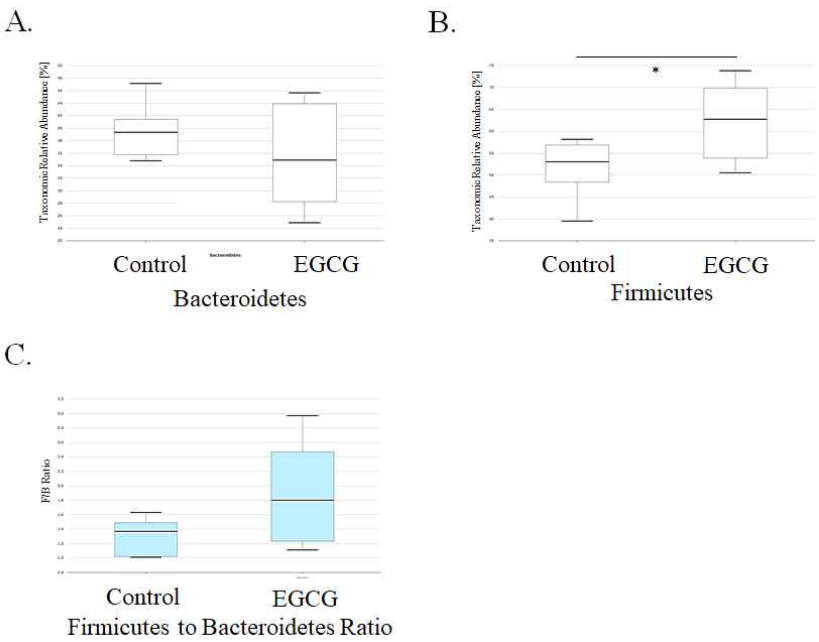


그림30. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 분변 내 박테리아의 phylum 수준에서 나타내는 박테리아 균의 abundant 변화. (A) Bacteroidetes, (B) Firmicutes (C) Firmicutes/Bacteroidtes의 상대적 비율

(파) 고순도 EGCG에의해 가장 변화량이 크게 나타난 10개의 박테리아 genus를 확인한 결과 다음의 표와 같았다.

표2. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 분변 내 박테리아의 genus 수준에서 나타내는 박테리아 균속 변화

Taxon name	Taxonomy	Control	EGCG	p-value
Lactobacillus	Bacteria: Firmicutes: Bacilli: Lactobacillales: Lactobacillaceae	13.891	29.061	0.04
Escherichia	Bacteria: Proteobacteria: Gammaproteobacteria: Enterobacteriales: Enterobacteriaceae	3.992	0.001	0.01
Enterococcus	Bacteria: Firmicutes: Bacilli: Lactobacillales: Enterococcaceae	0.313	0.002	0.01
Bacteroidaceae_uc	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae	0.247	0.073	0.02
Morganella	Bacteria: Proteobacteria: Gammaproteobacteria: Enterobacteriales: Enterobacteriaceae	0.179	0.000	0.02
Bilophila	Bacteria: Proteobacteria: Deltaproteobacteria: Desulfovibrionales: Desulfovibrionaceae	0.032	0.008	0.04
Acinetobacter	Bacteria: Proteobacteria: Gammaproteobacteria: Pseudomonadales: Moraxellaceae	0.026	0.000	0.02
Lysinibacillus	Bacteria: Firmicutes: Bacilli: Bacillales: Planococcaceae	0.018	0.000	0.02
Aeromonas	Bacteria: Proteobacteria: Gammaproteobacteria: Aeromonadales: Aeromonadaceae	0.002	0.000	0.02

(하) EGCG에 의해 가장 크게 변화가 나타난 Lactobacillus의 균종들이 변화가 나타나는 것을 확인하고자 Lactobacillus gasseri, Lactobacillus intestinalis, Lactobacillus reuteri의 발현량의 변화를 분석하였다. 그 결과 고순도 EGCG를 투여한 실험동물의 분변에서는 Lactobacillus gasseri(A)의 양이 증가한 것으로 나타났다. 마찬가지로 고순도 EGCG는 Lactobacillus intestinalis, Lactobacillus reuteri의 abundance가 증가하는 것으로 분석되었다.

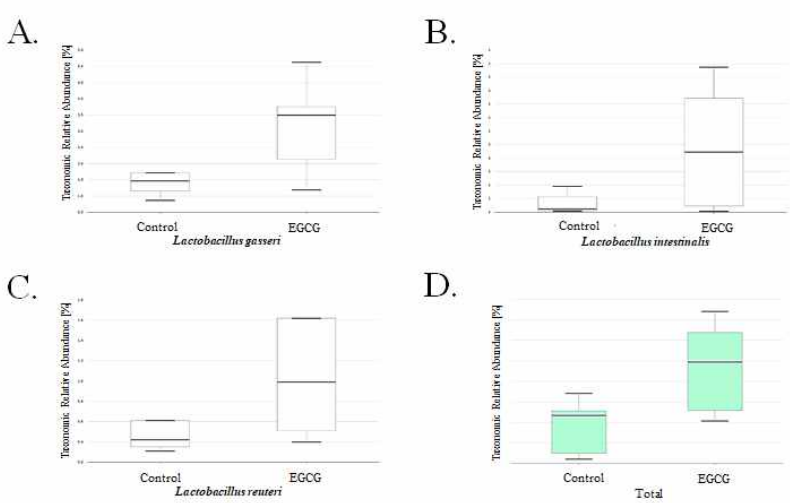


그림31. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 분변 내 박테리아의 Lactobacillus의 균종에서 나타내는 abundance의 변화 (A) Lactobacillus gasseri, Bacteroidetes, (B) Lactobacillus intestinalis, (C) Lactobacillus reuteri, (D) 전체 lactobacillus

(하1) 고순도 EGCG에의해 가장 변화량이 크게 나타난 박테리아 species를 분석한 결과 다음의 표와 같았다.

Taxon_name	Taxonomy	Control	EGCG	p-value
Escherichia coli group	Bacteria: Proteobacteria: Gammaproteobacteria: Enterobacteriales: Enterobacteriaceae: Escherichia	3.937	0.001	0.01
Bacteroides vulgatus	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae: Bacteroides	2.133	0.282	0.01
Bacteroides_uc	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae: Bacteroides	1.303	0.300	0.04
Weissella hellenica group	Bacteria: Firmicutes: Bacilli: Lactobacillales: Leuconostocaceae: Weissella	1.159	0.011	0.01
Enterobacter asburiae group	Bacteria: Proteobacteria: Gammaproteobacteria: Enterobacteriales: Enterobacteriaceae: Enterobacter	0.486	0.002	0.02
Morganella morganii group	Bacteria: Proteobacteria: Gammaproteobacteria: Enterobacteriales: Enterobacteriaceae: Morganella	0.177	0.000	0.02
Bacteroides caccae	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae: Bacteroides	0.158	0.022	0.04
Enterococcus casseliflavus group	Bacteria: Firmicutes: Bacilli: Lactobacillales: Enterococcaceae: Enterococcus	0.150	0.000	0.02
Enterococcus faecalis	Bacteria: Firmicutes: Bacilli: Lactobacillales: Enterococcaceae: Enterococcus	0.109	0.002	0.01
Bacteroides dorei	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae: Bacteroides	0.105	0.012	0.02
Bilophila wadsworthia	Bacteria: Proteobacteria: Deltaproteobacteria: Desulfovibrionales: Desulfovibrionaceae: Bilophila	0.032	0.008	0.04
ADDX_s	Bacteria: Firmicutes: Clostridia: Clostridiales: Ruminococcaceae: Pseudoflavonifractor	0.027	0.009	0.02
Acinetobacter radioresistens	Bacteria: Proteobacteria: Gammaproteobacteria: Pseudomonadales: Moraxellaceae: Acinetobacter	0.018	0.000	0.02
Parabacteroides gordonii	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Porphyromonadaceae: Parabacteroides	0.014	0.003	0.02
Alistipes indistinctus	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Rikenellaceae: Alistipes	0.004	0.000	0.01
Aeromonas caviae group	Bacteria: Proteobacteria: Gammaproteobacteria: Aeromonadales: Aeromonadaceae: Aeromonas	0.002	0.000	0.02
Bacteroides acidifaciens	Bacteria: Bacteroidetes: Bacteroidia: Bacteroidales: Bacteroidaceae: Bacteroides	0.000	0.002	0.02

표3. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 분변 내 박테리아의 species 수준에서 나타내는 박테리아 균속 변화

(하2) 고순도 EGCG가 기타 박테리아의 abundance에 미치는 영향을 확인하기 위하여 체중을 조절하고 비만의 정도와 상당한 연관관계가 있는 Christensenellanceae의 abundance를 확인하였다. 그 결과 고순도 EGCG를 투여한 실험동물에서 해당 박테리아의 균속이 유의적으로 증가하고 있음을 확인할 수 있었다.

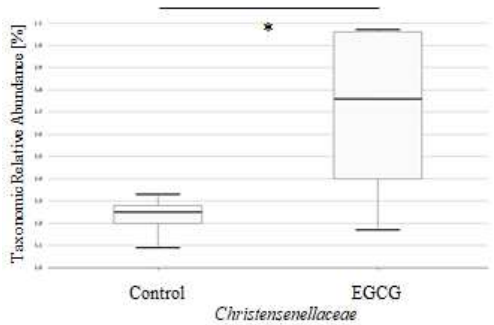


그림32. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 분변 내 박테리아인 Christensenellanceae의 abundance에 미치는 영향

(하3) 고순도 EGCG가 기타 박테리아의 abundance에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Enterobacteriaceae의 abundance를 확인하였다. 본 bacteira 균속은 기회감염균 또는 일부 병원성을 가지는 대장균 속으로써 과도한 abundance는 장환경에 영향을 주어 이와 관련된 소화기 질환을 나타날 수 있다. 이에 이 균속의 abundance를 확인한 결과 고순도 EGCG를 투여한 실험동물에서 해당 박테리아의 균속이 유의적으로 감소하고 있음을 확인할 수 있었다.

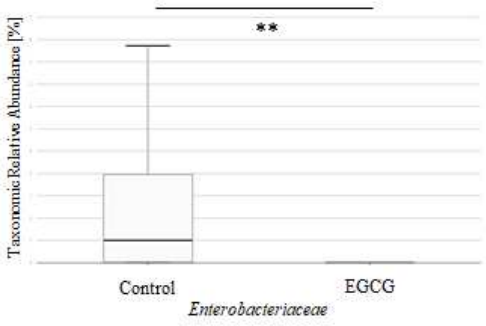


그림33. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 분변 내 박테리아인 Enterobacteriaceae의 abundance에 미치는 영향

(하4) Proteobacteria는 사람의 장내에 살고 있는 정상균무리이다. 그러나 이 균속의 분포가 증가하게 되면 장에서 염증반응을 일으키고 dysbiosis를 유발하여 장 질환을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이에 해당 균속의 abundance에 고순도 EGCG가 미치는 영향을 확인하였다. 그 결과 Proteobacteria는 고순도 EGCG에 의하여 유의적으로 감소하고 있음을 확인하였다.

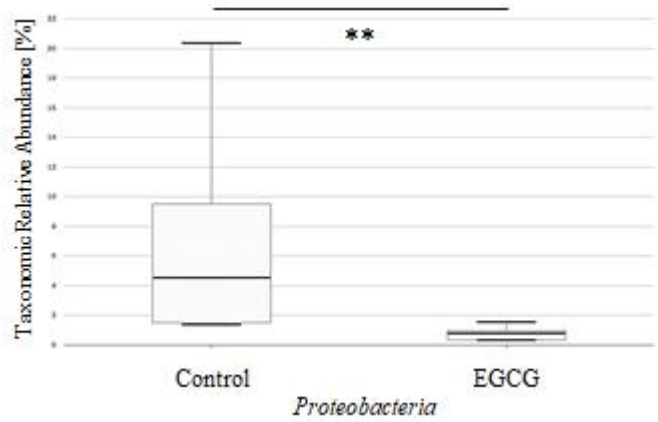


그림34. 비만/당뇨 동물모델인 db/db mouse에서 고순도 EGCG가 실험동물의 분변 내 박테리아인 Proteobacteria의 abundance에 미치는 영향

(하5) 이상의 결과를 종합하면 고순도 EGCG는 유전자 변이에 의해 당뇨가 유발되는 db/db mouse에 있어서 당뇨의 형성을 억제하고 혈액내 생화학적 지표를 개선하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 변화는 장내미생물의 변화를 통해 나타내는 것으로 여겨진다.

4. 고순도 EGCG의 인지능력장애 개선 효능에 대한 in vitro (세포배양) 평가

가. 연구 방법

(1) 세포배양

(가) 본 실험에 사용된 인간 유래 SH-SY5Y neuroblastoma 세포는 한국세포주은행(Korea cell line Bank, Seoul, Korea)에서 구매하였으며, Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM, Lonza, Walkersville, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Lonza, Basel, Switzerland)과 1% P/S (penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 µg/ml (Lonza))을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 세포배양기에서 배양하였다.

(나) 세포생존율 측정

신경세포에 나타나는 손상에 대한 EGCG의 보호효과를 알아보기 위하여 H_2O_2로 세포사멸을 유도한 신경세포주에 EGCG가 나타내는 생포생존율 실험을 진행하였다. SH-SY5Y 세포주를 96-well plate에 각 well 당 4×10^5 cells/ml의 농도로 세포를 100 µl씩 분주 한 후 세포들이 부착될 수 있도록 1일간 37℃, 5% CO_2의 세포배양기에 배양하였다. 시간이 경과된 후 다양한 농도 (1, 10, 25 µM)의 EGCG를 1시간 동안 전처리하고, 이후 Hydrogen Peroxide (H_2O_2, 100 µM)를 세포에 처리해 주었다. 24시간 동안 세포배양기에서 배양한 후, 세포생존율을 확인하기 위해, EZ-Cytox (DoGen, Korea) reagent를 10 µl씩 각 well에 첨가해 주었다. 4시간 후에 microplate reader (Molecular Device, Sunnyvale, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포생존율을 확인하였다.

(2) 단백질 발현 측정 (western blot)

(가) 세포 내 단백질 발현 변화를 측정하기 위하여 시약처리가 끝난 SH-SY5Y 세포에 차가운 phosphate buffered saline (PBS)로 두 번 세척해 주었다. Protease inhibior cocktail과 phosphatase inhibitor cocktail (Sigma, St.Louis, USA)이 첨가된 RIPA buffer 150 µl로 용해하여 얼음에서 30분간 방치한 후, 13,000 rpm, 4℃에서

20분간 원심분리한 후 상층액을 얻었다. 얻어진 단백질을 BCA (INtron, Korea)방법으로 정량하였다. 총단백질량을 30 μg으로 동일하게 10% SDS-PAGE 로 전기영동 후, polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 옮겼다. 5% skim milk가 포함된 TBST로 한 시간 동안 상온에서 blocking하고 4℃에서 하루 동안 1차 항체 (phospho-CREB, CREB, BDNF 이하 1:1,000 희석, β-actin, 1:10,000 희석)와 반응시켰다. Phospho-CREB, BDNF는 Santa Cruz (Dallas, USA)에서 그리고 CREB 항체와 2차 항체는 Cell signaling technology Inc. (Danvers, USA)으로부터 구입하였으며, β-actin 항체는 Sigma에서 구입하였다. TBST로 10분간 3회 수세한 후, HRP(horseradish peroxidase)가 붙어있는 이차 항체와 한 시간 동안 반응시켰다. TBST로 10분간 3회 세척 후 AmershamTM ECL SelectTM Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, Chicago, USA)을 사용하여 발광하였으며, ChemiDocTM XRS+ System(Bio-rad, Hercules, USA)을 사용하여 영상을 저장하였다.

나. 연구 결과

(1) 고순도 EGCG의 SH-SY5Y 신경세포주에 대한 세포독성 평가

SH-SY5Y 신경세포주에서 고순도 EGCG가 미치는 세포독성을 평가하였다. 그 결과, 고순도 EGCG가 신경세포에서 25 μM 농도까지 세포독성을 나타내지 않는 것을 확인하였다. (그림35)

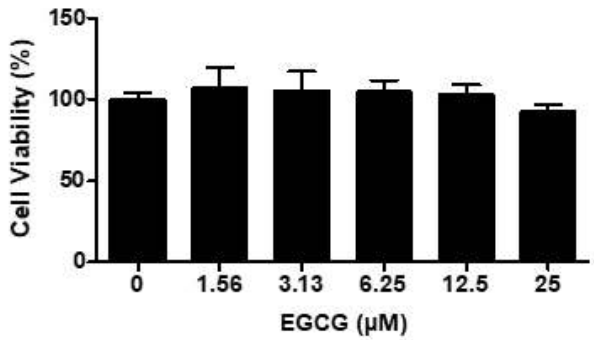


그림35. Cytotoxicity test of high purity EGCG in SH-SY5Y cell line. 고순도 EGCG의 신경세포에서의 세포독성 효과. SH-SY5Y 신경세포주에 고순도 EGCG를 표시된 농도로 처리한 후,

24시간 후에 세포의 생존율을 Ez-Cytox로 측정하였다.

(2) 고순도 EGCG의 신경세포 손상 보호 효과

고순도 EGCG가 신경세포의 손상에 대한 보호효과를 평가하기 위하여 SH-SY5Y 신경세포주에 과산화수소(H_2O_2)를 처리하여 세포사멸을 유도하고 고순도 EGCG를 1, 10, 25 μM의 농도로 처리한 뒤 세포의 생존율을 측정하였다. 정상군의 세포생존율을 100%로 설정하였을 때 과산화수소를 투여한 대조군에서는 세포생존율이 크게 감소하였다. 그러나 고순도 EGCG를 처리한 세포에서는 세포생존율이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다. (그림36)

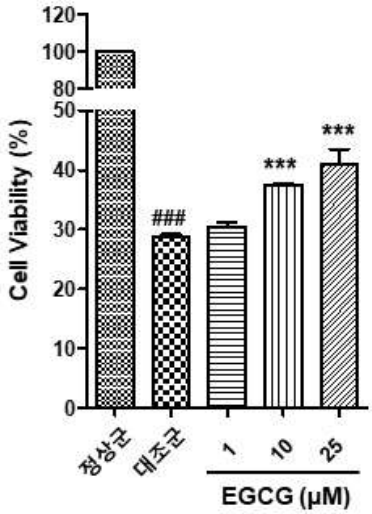


그림36. Protective effect of high purity EGCG on neuronal cell death in SH-SY5Y cell line. 신경세포주인 SH-SY5Y 세포주에 고순도 EGCG를 1, 10, 25 μM의 농도로 1시간 전처리한 뒤 H_2O_2 (100 μM)를 투여하여 세포사멸을 24시간 동안 유도하였다. 세포의 생존율을 Ez-Cytox로 측정하였다. ###p<0.001 vs. 정상군, ***p<0.001 vs. 대조군.

(3) 고순도 EGCG가 BDNF의 발현에 미치는 효과

고순도 EGCG가 신경세포의 기능을 회복시키는데 도움을 주는지 세포배양 및 분자생물학적 수준에서 확인하고자 SH-SY5Y 신경세포주에 고순도 EGCG를 투여하고 BDNF가 단백질로 발현되는 것을 웨스턴블

랏으로 평가하였다. 그 결과, EGCG를 투여하면 SH-SY5Y 세포에서 BDNF의 발현이 증가하였다. (그림37)

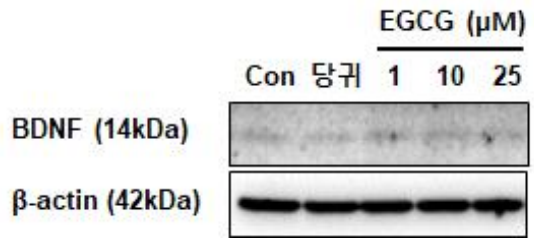


그림37. Effect of high purity EGCG on BDNF expression in SH-SY5Y cell lines. SH-SY5Y 신경세포주에 고순도 EGCG를 농도별로 24시간 동안 처리한 후, 세포질에서 단백질을 분리하고 웨스턴블랏으로 BDNF의 발현량을 확인하였다. Con; PBS를 투여한 대조군, 당귀; 양성대조군.

(4) 고순도 EGCG가 CREB의 인산화에 미치는 효과

cAMP response element binding(CREB)가 활성화되면 BDNF 유전자의 발현이 증가한다. 이에 고순도 EGCG가 CREB의 활성화에 영향을 미치는지 확인하고자 SH-SY5Y에 고순도 EGCG를 1시간 동안 전처리하고 과산화수소를 30분간 처리하여 인산화되는 CREB의 양을 웨스턴블랏으로 측정하였다. 그 결과, 고순도 EGCG에 의하여 CREB의 인산화가 농도별로 증가하는 것을 확인하였다(그림38).

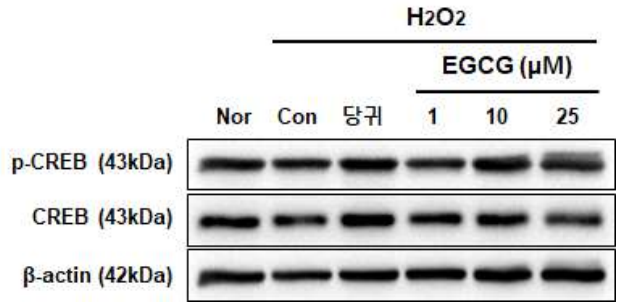


그림38. Effect of high purity EGCG on phosphorylation of CREB in SH-SY5Y cell lines. SH-SY5Y 신경세포주에 고순도 EGCG를 농도별로 1시간 동안 전처리한 후 H_2O_2를 (70 μM) 30분 동안 처리하였다. 인산화된 CREB의 발현을 웨스턴블랏으로 측정하였다. Nor; H_2O_2 투여하지 않은 정상군, Con; H_2O_2 투여한 대조군, 당귀; 양성대조군.

5. 고순도 EGCG의 인지능력장애 개선 효능에 대한 in vivo (실험동물) 평가

가. 연구 방법

(1) 실험동물 사육

실험 동물은 대한바이오링크 (Eum-seong, Korea)에서 6주령 수컷 C57/BL6 마우스(19-22 g)를 분양받아 사용하였다. 동물은 실험 당일까지 고형사료와 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다. 실험동물은 자유식이 하면서 온도는 23±1℃로 맞추었고 주야 12시간 (light-darkcycle)의 환경에서 7일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 본 연구의 동물 실험에 관한 모든 사항은 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 후 진행하였다.

(2) 투여기간 및 용량의 설정

고순도 EGCG의 인체투여용량을 기준으로 실험동물 투여량인 40 mg/kg를 중간농도로 설정하고 각각 20 mg/kg의 용량 차이를 두어 20 mg/kg와 60 mg/kg의 농도를 설정하였다. 투여기간은 투여 개시일을 기준으로 6주간 1일 1회로 경구투여 하기로 하였다.

(3) 인지장애 동물모델 구축 및 치사

실험동물에게 EGCG를 20, 40, 60 mg/kg의 농도로 6주간 매일 1일 1회 경구투여 하였다. EGCG는 PBS에 용해하였으며 경구투여하는 시료는 모두 200 μl의 부피로 맞추었다. 대조군은 증류수를 200 μl씩 매일 경구투여하였다. 양성대조군은 인지능력개선 개별인정원료인 당귀추출물을 150 mg/kg의 농도로 6주간 매일 경구투여하였다. 실험 종료일에는 scopolamine 1 mg/kg를 복강투여하여 기억력 감소를 유도하였으며, 약물 투여 후 30분 후에 Y-미로 시험, 수동회피시험, 모리스 수중미로 시험의 순서로 행동 테스트를 실시하였다. 행동테스트 후에 마취를 시키고 부검을 통해 실험동물의 뇌를 적출한 뒤 해마조직을 분리하였다.

(4) Y-미로 실험 (Y-maze test)

폭×길이×벽이 10×40×15 cm인 통로 3개가 Y자 모양의 120° 각도를 이루도록 되어있는 미로를 활용하여 인지능력을 검증하였다. 각 통로를

A, B, C로 정하고 한쪽 통로에 실험동물을 놓고 자유롭게 움직이도록 하여 5분 동안 각 통로에 들어간 횟수와 순서를 기록하였다. 이때 각 통로에 들어간 횟수와 순서는 꼬리가 완전히 들어간 경우에 한했으며, 반복해서 동일한 통로에 다시 들어간 경우도 기록하여 총출입횟수로 정하였다. 3개의 서로 다른 통로에 순차적으로 들어간 경우 즉 ABC, CAB, BCA 등의 순서로 들어간 경우를 실제변경횟수로 지정하고 1점씩을 부여하였으며, 변경행동력 (spontaneous alternation, %)은 다음의 식에 의해 계산하였다.

변경행동력(%) = 실제변경횟수/(총출입횟수-2)×100

(5) 수동회피 시험 (Passive avoidance test)

수동회피 실험은 동일한 구조의 조명이 있는 방과 조명이 없는 방이 칸막이 문으로 연결되어 있는 장치에서 수행하였다. 조명이 있는 방은 흰색으로 되어 밝은 환경에 노출될 수 있도록 하였으며 조명이 없는 방은 검은 색으로 제작하여 어두운 환경을 제공할 수 있도록 하였다. 수동회피시험에 대한 훈련을 시작할 때 실험동물을 조명이 비추는 밝은 쪽 방에 놓고 칸막이를 막은 채 10초간 탐색하도록 한 다음에 칸막이를 열어 어두운 방으로 들어갈 수 있도록 하였다. 실험동물의 네 발과 꼬리까지 어두운 방으로 완전히 들어가면 칸막이 문을 닫은 후 바닥의 철망을 통해 5초 동안 0.2 mA의 전기 자극으로 통증을 주었다. 훈련은 2일간 1일 1회 같은 시간에 실시하였다. 실험 종료일에는 칸막이를 제거한 채 실험동물을 밝은 쪽 방에 놓아 주고 전기 자극을 받았던 어두운 방으로 들어가는데 걸리는 시간을 300초까지 측정하였다. 시간 안에 실험동물이 어두운 방에 들어가지 않으면 300초로 시간을 지정하였다.

(6) 모리스 수중미로 시험 (Morris water maze test)

(가) 수중 미로로 이용되는 수조는 직경이 90 cm, 높이가 30 cm인 원형 통으로 온도가 22±2℃되는 물을 채웠으며 우유를 섞어 물을 불투명하게 만들어 물 속이 보이지 않도록 하였다. 남쪽 벽면에 가로×세로가 각각 20 cm인 붉은 색 별 모양의 공간단서를 붙였다. 공간단서에서 10 cm 떨어진 수조 안쪽에는 직경이 10 cm, 높이가 20 cm인 원형 platform을 설치하였다. platform은 수면보다 1.5 cm 낮게 설치하여

육안으로 확인할 수 없도록 하였다.

실험동물의 훈련은 인지능력 검사 4일전부터 1일 1회 실시하였다. 수조를 가상으로 사분면으로 나누고 platform이 놓인 사분면을 제외한 곳을 출발지로 정하고 실험동물이 수영을 시작하도록 하였다. 훈련기간 동안에는 180초 동안 실험동물이 platform을 찾도록 자유수영을 하도록 하였으며 시간 안에 platform을 찾지 못하면, platform을 찾아 가게끔 유인한 후 platform 위에서 15초간 머무르게 하였다.

(나) 실험 종료일에는 platform을 수조에서 제거한 뒤 수중미로의 사분면의 한가운데부터 수영을 하도록 하였으며 실험 동물의 행동은 비디오 카메라로 90초 동안 녹화하고 행동분석 프로그램(SMART 3.0, Panlab S.I., Barcelona, Spain)으로 행동을 분석하였다.

(7) 뇌조직의 단백질 분석

실험동물의 뇌에서 해마영역을 분리하고 protease inhibitor cocktail이 포함된 RIPA buffer 150 μl를 넣고 초음파분산기(sonicator)를 이용하여 용해시켰다. 균질액을 12,000 rpm에서 20분간 4℃에서 원심분리 후 상층액만을 얻었다. 이후의 시험은 3.3.3.과 동일하게 진행하였다.

나. 연구 결과

(1) Y-미로 시험 (Y-maze test)

(가) 고순도 EGCG가 실험동물에서 인지능력 개선에 미치는 영향을 확인하고자 Y-미로 시험을 수행하였다. 고순도 EGCG를 C57BL/6 마우스에 20, 40, 60 mg/kg로 6주간 경구투여한 뒤 scopolamine로 인지장애를 유발시킨 뒤 Y-미로에서 실험동물이 나타내는 행동을 평가하였다.

(나) Y-미로의 각 통로를 번갈아가며 들어가는 변경행동력 (spontaneous alternation)을 통해 인지능력을 평가한 결과 scopolamine을 투여한 대조군은 정상군에 비해 변경행동력이 크게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 20, 40 mg/kg의 고순도 EGCG를 경구투여한 실험동물에서는 변경행동력이 개선되는 것이 관찰되었으나 유의적이지 않았다. 반면 60 mg/kg 투여군은 대조군과 비슷하였다. (그림39)

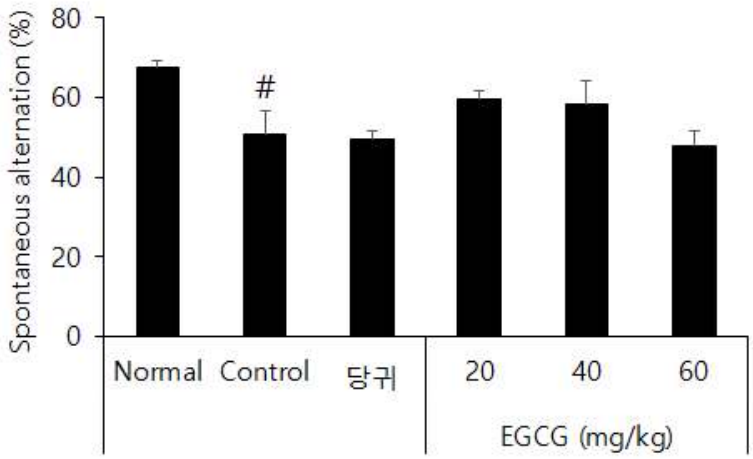


그림39. Effect of high purity EGCG on spontaneous alternation of Y-maze test in scopolamine-induced memory deficit animal model of C57BL/6 mouse. 고순도 EGCG를 6주간 경구투여한 C57BL/6 마우스에 scopolamine을 복강투여하여 인지능력 장애를 유발하고 Y-미로시험을 5분간 수행하였다. Y-미로의 각 통로를 들어간 총합에 대비하여 각 통로를 순차적으로 완전히 번갈아 들어간 횟수의 비율을 통해 변경행동력을 구하였다. #p<0.05 vs. Normal. Normal; 정상군, Control; scolpolamine을 투여한 대조군, 당귀; 양성대조군 (150 mg/kg).

(2) 수동회피시험 (Passive avoidance test)

(가) 고순도 EGCG가 실험동물에서 인지능력 개선에 미치는 영향을 확인하고자 수동회피 시험을 수행하였다. 고순도 EGCG를 C57BL/6 마우스에 20, 40, 60 mg/kg로 6주간 경구투여한 뒤 수동회피장치를 통해 마우스가 암실에 들어가면 통증을 유발하는 전기자극을 주는 훈련을 1일 1회씩 2회 실시하여 암실에 대한 회피 기억을 주었다. 행동평가 당일 scopolamine로 인지장애를 유발시킨 실험동물을 수동회피장치에 넣고 암실로 이동할 때까지 지연되는 시간을 측정하여 인지능력을 평가하였다.

(나) 그 결과 인지장애를 유발한 실험동물은 정상군에 비해 암실로 들어갈 때 까지 지연되는 시간이 유의적으로 크게 감소하는 것이 관찰되었다. 반면 고순도 EGCG를 투여한 실험동물은 농도의존적으로 암실에 이동하는 시간이 유의적으로 지연되어 인지능력이 개선되는 것이 관찰되었다. (그림40)

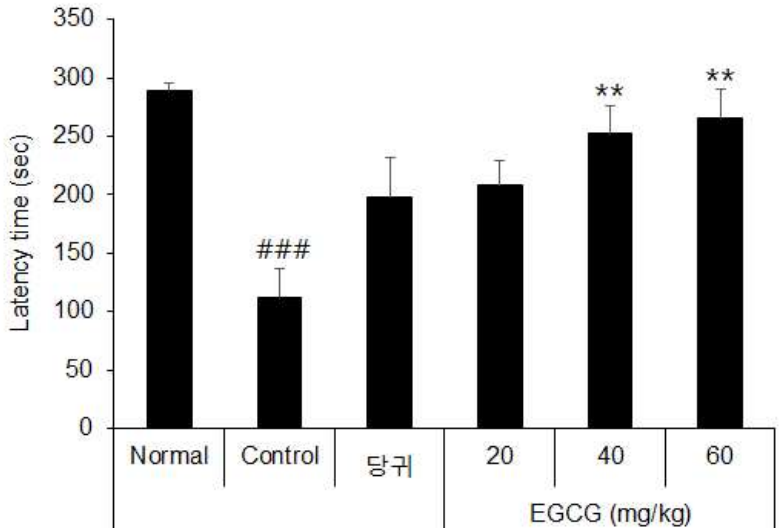


그림40. Effect of high purity EGCG on passive avoidance test in scopolamine-induced memory deficit animal model of C57BL/6 mouse. 고순도 EGCG를 6주간 경구투여한 C57BL/6 마우스에 2회에 걸쳐 전기자극을 통해 암실회피에 대한 기억을 생성하였다. scopolamine을 복강투여하여 인지능력 장애를 유발한 실험동물이 명실에 들어간 순간부터 암실로 이동할 때까지의 시간을 측정하였다. ###p<0.001 vs. Normal, **p<0.01 vs. Control. Normal; 정상군, Control; scolpolamine을 투여한 대조군, 당귀; 양성대조군 (150 mg/kg).

(3) 모리스 수중미로시험 (Morris water maze test)

(가) 실험동물 이동경로 추적

고순도 EGCG가 실험동물에서 인지능력 개선에 미치는 영향을 확인하고자 모리스 수중미로 시험을 수행하였다. 고순도 EGCG를 C57BL/6 마우스에 20, 40, 60 mg/kg로 6주간 경구투여한 뒤 4회의 모리스 수중미로 훈련을 180초씩 실시하였다. 행동평가 당일 scopolamine으로 인지장애를 유발한 뒤 수중 플랫폼을 제거하고 90초 동안 실험동물이 이동한 경로를 추적하였다. (그림41)

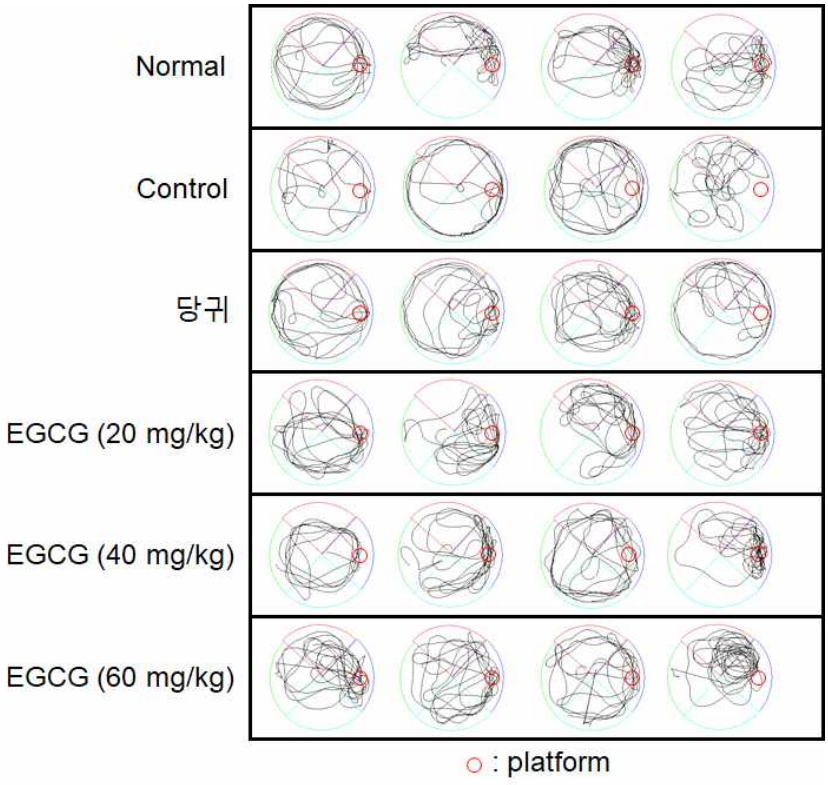


그림41. Effect of high purity EGCG on movement of morris water test in scopolamine-induced memory deficit animal model of C57BL/6 mouse. 고순도 EGCG를 6주간 경구투여한 C57BL/6 마우스에 4회에 걸쳐 모리스 수중시험 훈련을 실시하여 플랫폼에 대한 기억을 생성하였다.. scopolamine을 복강투여하여 인지능력 장애를 유발한 실험동물이 플랫폼을 제거한 수중미로에서 나타내는 이동경로를 90초 동안 적하여 기록하였다. 실험동물의 이동경로 추적데이터 중 일부만 발췌하여 제시하였다. Normal; 정상군, Control; scolpolamine을 투여한 대조군, 당귀; 양성대조군 (150 mg/kg).

(나) 모리스 수중미로 사분면 잔여시간

모리스 수중시험에서 실험동물이 플랫폼이 설치된 사분면에서 머무는 시간을 측정하여 인지능력을 평가한 결과 정상군에 비해 대조군에서는 플랫폼이 존재하고 있던 위치의 사분면에 머무는 시간이 크게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 고순도 EGCG를 20, 40, 60 mg/kg 투여한 실험동물에서는 사분면에 머무는 시간이 유의적으로 증가하는 것이 관찰되었다. (그림42)

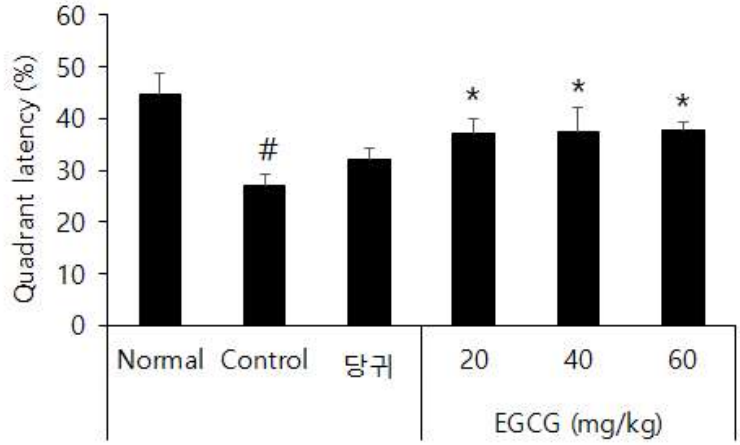


그림42. Effect of high purity EGCG on quadrant latency of morris water maze test in scopolamine-induced memory deficit animal model of C57BL/6 mouse. 고순도 EGCG를 6주간 경구투여한 C57BL/6 마우스에 4회에 걸쳐 모리스 수중시험 훈련을 실시하여 플랫폼에 대한 기억을 생성하였다. scopolamine을 복강투여하여 인지능력 장애를 유발한 실험동물이 플랫폼을 제거한 수중미로에서 나타내는 행동을 90초 동안 관찰하였다. 수중미로를 4개의 가상구역으로 나뉜 뒤 플랫폼이 위치한 사분면에 실험동물이 머무는 시간을 측정하고 전체분석시간 대비 플랫폼이 위치한 사분면에 머문 상대적 비율을 계산하였다. #$p<0.05$ vs. Normal, *$p<0.05$ vs. Control. Normal; 정상군, Control; scolpolamine을 투여한 대조군, 당귀; 양성대조군 (150 mg/kg).

(다) 플랫폼 위치 횡단횟수

모리스 수중시험에서 실험동물이 플랫폼이 설치된 위치에 몇 번 찾아왔는지 횟수를 측정하여 인지능력을 평가한 결과 정상군에 비해 대조군에서는 플랫폼 위치를 정확히 찾아온 횟수가 크게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 반면 고순도 EGCG를 20, 60 mg/kg 투여한 실험동물에서는 플랫폼이 존재했던 위치를 찾아온 횟수가 유의적으로 증가하는 것이 관찰되었다. 40 mg/kg의 경우 대조군에 비해 증가하였으나 유의적이지 않았다. (그림43)

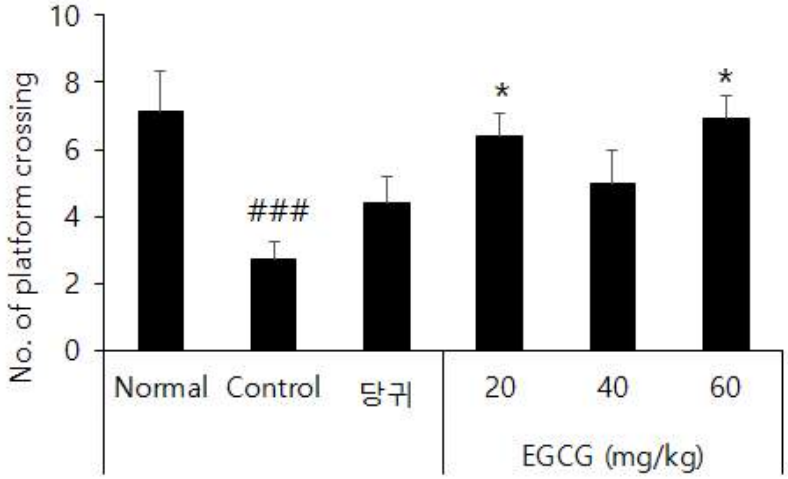


그림43. Effect of high purity EGCG on number of platform crossing of morris water maze test in scopolamine-induced memory deficit animal model of C57BL/6 mouse. 고순도 EGCG를 6주간 경구투여한 C57BL/6 마우스에 4회에 걸쳐 모리스 수중시험 훈련을 실시하여 플랫폼에 대한 기억을 생성하였다. scopolamine을 복강투여하여 인지능력 장애를 유발한 실험동물이 플랫폼을 제거한 수중미로에서 나타내는 행동을 90초 동안 관찰하였다. 시간 안에 플랫폼이 위치한 장소로 실험동물이 찾아온 횟수를 측정하였다. ###$p<0.001$ vs. Normal, *$p<0.05$ vs. Control. Normal; 정상군, Control; scolpolamine을 투여한 대조군, 당귀; 양성대조군 (150 mg/kg).

(라) 고순도 EGCG가 BDNF와 5-HT1a의 발현에 미치는 영향

고순도 EGCG가 실험동물의 뇌에서 인지능력 개선과 관련된 유전자들의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험동물에게 6주동안 고순도 EGCG를 투여하고 해마조직을 분리한 뒤 BDNF와 5-HT1a의 발현을 웨스턴블랏으로 측정하였다. 그 결과 대조군(Con)에 비해 EGCG를 투여한 실험동물의 해마에서 BDNF와 5-HT1a의 발현량이 증가하는 것이 관찰되었다. (그림44)

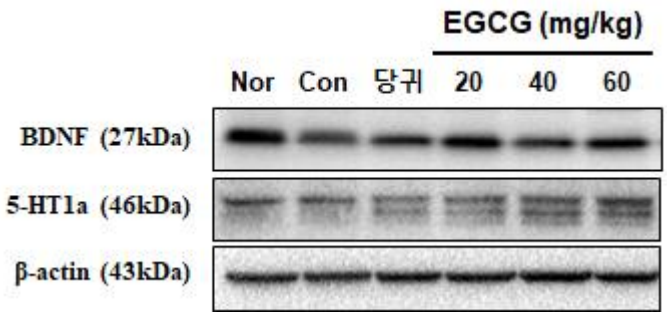
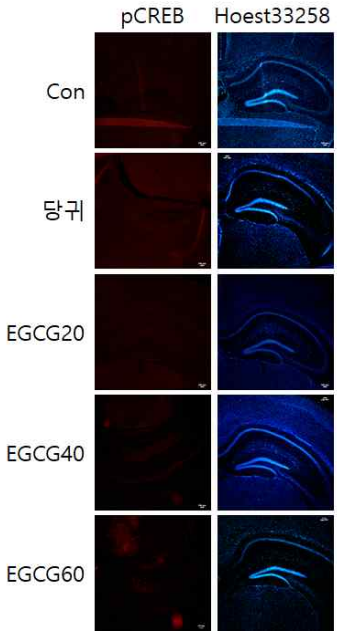


그림44. Effects of high purity EGCG on productions of BDNF and 5-HT1a in hippocampus of scopolamine-induced memory deficit C57BL/6 mouse. 고순도 EGCG를 6주간 투여한 실험동물의 해마를 적출한 뒤 단백질을 추출하고 BDNF와 5-HT1a의 단백질 변화를 웨스턴블럿으로 확인하였다.

(마) 고순도 EGCG가 뇌조직에서 pCREB의 활성에 미치는 영향

고순도 EGCG가 실험동물의 뇌에서 인지능력 개선과 관련된 유전자들의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험동물에게 6주동안 고순도 EGCG를 투여하고 뇌조직을 분리한 뒤 pCREB의 발현을 immunofluorescence로 측정하였다. 그 결과 대조군(Con)에 비해 EGCG를 투여한 실험동물의 해마에서 붉은 형광색을 나타내는 pCREB의 양이 증가하는 것이 관찰되었다. (그림10)



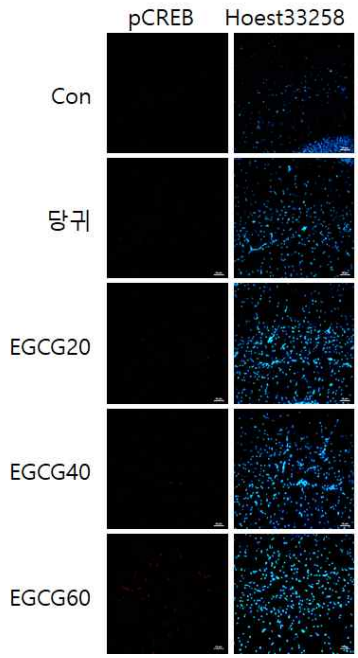


그림45. Effects of high purity EGCG on productions of pCREB in hippocampus of scopolamine-induced memory deficit C57BL/6 mouse. 고순도 EGCG를 6주간 투여한 실험동물의 뇌를 적출한 뒤 조직슬라이드를 제작하였다. 인산화된 CREB와 결합하는 항체를 사용하여 pCREB는 붉은색으로 측정하였고 신경세포의 핵은 Hoest33258로 염색하였다. 면역염색된 조직슬라이드는 X40배의 배율로 측정하였으며 (좌), 해마영역의 CA1 부위는 X200 배의 해상도로 관찰하였다(우).

(4) 모리스수중미로 평가는 공간학습능력에 대한 기억력 평가방법으로 사용되고 있으며 명시적 기억능력을 평가하는 방법으로 주로 수동회피시험이 널리 사용되고 있다. 단기기억 검사법으로는 Y-maze test가 비임상시험에서 활용되고 있다. 본 시험에서도 고순도 EGCG가 가지는 인지기능 개선 효능을 평가하고자 인지능력이 저하된 실험동물모델을 사용하여 행동평가를 실시하였다. 수동회피시험에서 고순도 EGCG를 투여한 모든 시험동물에서 지연시간이 증가하는 것이 농도의존적으로 관찰되었으며 모리스 수중미로 시험에서도 플랫폼위치의 사분면에 잔여하는 시간도 고순도 EGCG에 의해 유의적으로 증가하는 것이 관찰되었다. 또한 플랫폼 위치 횡단횟수도 고순도 EGCG가 유의적으로 증가시키는 것이 관찰되었다. 비록 Y-미로 시험에서 고순도 EGCG가 투여한 실험동물의 자발적 변경행동력을 유의적인 수준으로 변화를 이끌어

내지는 못하였으나 인지능력이 손상된 대조군에 비해 변경행동력이 증가된 것이 관찰되었다. 이러한 결과를 종합하면 실험동물에 있어서 고순도 EGCG는 기억력의 회복에 유효한 효능을 나타내는 것으로 사료된다.

이러한 기억력의 회복은 뇌신경의 보호효능을 통해 나타내는 것으로 여겨진다. 실험동물의 해마영역에서 발현되는 BDNF와 5-HT1a 단백질의 발현을 관찰한 결과 고순도 EGCG가 BDNF의 발현을 증가시키고 있었으며 5-HT1a의 발현도 증가시켰다. 세로토닌은 식사섭취, 감정조절의 기능을 담당하는 중요한 신경전달물질이다. 세로토닌의 수용체는 다양한 subtype이 있는데 그 중 뇌의 해마영역에 분포하는 5-HT1a는 기억 및 학습에 필수적인 세포토닌 수용체 subtype이다. 5-HT1a 유전자의 발현이 증가한 결과는 고순도 EGCG가 세로토닌에 대한 감수성을 증가시켜 인지능력을 개선할 수 있는 효력이 있음을 제시한다.

고순도 EGCG의 인지능력 개선 관련 유전자 발현 조절의 효능은 세포실험을 통해서도 확인하였다. 신경세포인 SH-SY5Y세포주에 EGCG를 투여하면 BDNF의 발현이 증가하는 것이 관찰되었다. 또한 고순도 EGCG가 BDNF의 발현을 조절하는 전사인자인 CREB의 인산화를 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 고순도 EGCG는 세포내신호전달 단배질인 CREB의 활성을 조절하여 BDNF의 발현을 증가시킴으로써 인지능력을 개선시키는 효능을 가지고 있는 것으로 판단된다.
또한, 고순도 EGCG는 세포사멸에 대항하여 신경세포의 소실을 억제하는 것으로 여겨진다. 뇌신경의 손상을 일으키는 다양한 원인 중에서 활성산소는 매우 중요한 손상 기전중 하나이다. 특히, 나이가 증가함에 따라 뇌영역에서 활성산소의 생성이 증가하며 알콜섭취에 따른 뇌손상도 활성산소에 기인한다. 본 연구에서는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 하나인 과산화수소로 세포에 손상을 유도하여 실제 인체의 신경세포가 경험하는 신경세포의 사멸에 대하여 고순도 EGCG의 억제효능을 측정하였다. 그 결과 고순도 EGCG는 활성산소에 의한 신경세포의 손상을 줄이는 효력을 가지고 있는 것을 관찰할 수 있었다.

(5) 위의 결과들을 종합하면 고순도 EGCG는 신경세포의 손상을 억제하고 인지기능과 관련된 유전자들의 발현을 해마영역에 존재하는 뇌신경세포에서 촉진함으로써 기억력개선의 효력을 나타내는 것으로 사료된다. 따라서 임상적으로 인체에서도 인지능력 개선에 긍정적인 효과가 기대된다.

제10절 인지기능개선 인체적용시험

인체적용시험 결과보고서

카테킨고함유녹차추출물의 인지기능 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약-대조 인체적용시험

인체적용시험용제품	**카테킨고함유녹차추출물, 위약**
의뢰자	**㈜알앤오식품**
계획서 번호	**RNO-CF-EG (Version 1.2)**
시험책임자	**전북대학교 의과대학 정신건강의학교실 정영철 MD, PhD**

❖ 요약(Synopsis)

제목	카테킨고함유녹차추출물의 인지기능 개선에 대한 유효성 및 안전성을 평가하기 위한 12 주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약-대조 인체적용시험
의뢰자	㈜ 알앤오식품
시험책임자	전북대학교 의과대학 정신건강의학교실 교수 정영철 M.D., Ph.D.
공동연구자	전북대학교 의과대학 약리학교실 교수 채수완 M.D., Ph.D. 전북대학교 의과대학 비뇨기과학교실 교수 김영곤 M.D., Ph.D. 전북대학교 의과대학 생화학교실 교수 박병현 M.D., Ph.D.
시험담당자	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터 정수진, 정은수, 황지현, 김우림, 장희연, 노순옥, 최재순 전북대학교 의과대학 정신건강의학교실 김광희, 신혜선, 김리나
실시기관	전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터
시험기간	2018. 12. 12 ~ 2019. 10. 08 (스크리닝 시작일 ~ 마지막 연구대상자 최종 방문일)
결과보고서 제출일	2019. 12. 27
인체적용시험용 제품명	시험제품 – 카테킨고함유녹차추출물 대조제품 – 위약군
시험목적	카테킨고함유녹차추출물의 12 주 섭취가 인지기능 및 관련 지표에 미치는 영향을 위약 섭취와 비교하여 평가한다. 1 차 목적 시각기억 검사(Visual learning test), 몬트리올 인지평가(MoCA-K)로는 인지기능 개선에 대한 카테킨고함유녹차추출물의 유효성을 위약 섭취와 비교 평가한다.

	2 차 목적 청각적 연속수행 검사 (Auditory continuous performance test), 언어기억 검사 (Verbal learning test), 시지각작업기억 검사 (Visual working memory test), 스트레스 검사 (PSS), 우울증 척도(BDI), 혈중 뇌유래신경영양인자 (BDNF), 항산화 지표 (TAS)로 평가되는 인지기능 개선에 대한 카테킨고함유녹차추출물의 유효성 및 안전성을 위약 섭취와 비교 평가한다.
연구대상자 수	총 80 명 (카테킨고함유녹차추출물 40 명, 위약군 40 명)
선정 기준	1) 스크리닝 검사 당시 연령이 만 60 세 이상인 자 2) 간이정신상태검사(Korean Mini-Mental Status Examination;KMMSE) 결과 25~28 점 인 자 3) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자
제외기준	1) 스크리닝 검사 당시 시행되는 정신장애의 진단 및 통계 편람의 구조화 된 임상면담인 SCID(Structured Clinical Interview for DSM-IV)에서 축 1 장애로 현재 치료를 받거나 최근 3 년 이내에 치료 받은 과거력이 있는 자 2) 스크리닝 검사 전 3 개월 이내에 알코올 남용이나 의존이 있는 자 3) 치료를 요하는 임상적으로 유의한 급성 또는 만성 심뇌혈관계, 내분비계, 면역계, 호흡기계, 간담도계, 신장 및 비뇨기계, 신경정신계, 근골격계, 염증성 및 혈액·종양성 질환, 위장관계질환 등이 있는 자 4) 녹차 성분에 임상적으로 유의한 과민반응의 병력이 있는자 5) 스크리닝 검사 전 1 개월 이내에 인지기능 및 기억력 개선 관련 의약품, 건강기능식품 또는 한약을 복용한 자 6) 스크리닝 검사 전 1 개월 이내에 전혈 헌혈을 하였거나, 2 주 이내에 성분헌혈을 한 자 7) 스크리닝 검사 전 3 개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자 8) 스크리닝 검사 전 3 개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자 9) 진단검사의학검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자 ☞ AST, ALT > 참고범위 상한치의 3 배

	☞ Serum Creatinine > 2.0 mg/dL 4) 진단검사의학 검사결과를 비롯한 기타 사유로 인하여 시험책임자가 연구 참여에 부적합하다고 판단한 자
시험방법	시험자는 서면동의서를 작성한 자원자에 한하여 스크리닝 검사를 시행하여 선정기준에 부합하는 연구대상자를 선정한다. 연구대상자는 스크리닝 방문으로부터 4 주 이내에 1 차 방문하여 연구대상자 선정/제외기준 적합성을 재검토 받은 후 인체적용시험에 등록되며, 카테킨고함유녹차추출물군과 위약군에 무작위배정되어 1 차 방문일까지 기초평가(Baseline)을 완료하였다. 이후 인체적용시험용제품을 하루 1 번씩 12 주간 섭취하면서 6 주마다 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 유효성평가, 활력징후, 약물투여력 및 의학적상태변화 조사, 이상반응 조사 등을 수행하였다. 시험자는 인체적용시험용제품 최종 섭취 후 혹은 조기종료 방문 후 필요에 따라 연구대상자 추적 관찰을 실시할 수 있다. 
섭취제품, 섭취방법	연구대상자는 다음 두 군 중 하나에 무작위배정 되어 12 주 동안 인체적용시험용제품을 1 일 1 회 경구 섭취하였다. · 카테킨고함유녹차추출물군 : 1 일 1 회, 1 회 1 캡슐, 아침 식후

	경구섭취(380 mg/day, 카테킨고함유녹차추출물로써 260 mg/day) 위약군 : 1 일 1 회, 1 회 1 캡슐, 아침 식후 경구섭취 (380mg/day, 카테킨고함유녹차추출물로써 0 mg/day)
평가기준	◆ 1 차 유효성 평가 · 시각기억검사(Visual learning test) · 몬트리올 인지평가(MoCA-K) ◆ 2 차 유효성 평가 · 청각적 연속수행 검사(Auditory continuous performance test) · 언어기억 검사(Verbal learning test) · 시지각작업기억 검사(Visual workingmemory test) · 스트레스 검사(PSS) · 우울증 척도(BDI) · 혈중 뇌유래신경영양인자(BDNF) · 항산화지표(TAS)
통계방법	◆ 분석에 사용할 프로그램은 Window 용 SAS 또는 SPSS 를 이용하고, 통계학적 유의수준은 *P* 값이 0.05 미만으로 설정하였다. ◆ 집단 간 기저치 분포의 차이가 있는지를 확인하기 위한 검정은 Chi-Square test 또는 Fisher's exact test 와 Independent t-test 를 이용하였다. ◆ 유효성 분석/안전성 분석 <u>1 차 유효성 평가 변수</u> 섭취 전 – 섭취 12 주 후의 시각기억검사, 몬트리올 인지평가 변화량에 대해서 섭취군별로 기술통계량을 제시하고, 시험군과 대조군간 차이에 대하여 independent t-test 를 이용하여 분석한다. 추가적으로, 각 섭취

	군 별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 시각기억검사, 몬트리올 인지평가 변화 차이는 paired t-test 를 이용하여 분석하였다. 또한 시각기억 검사, 몬트리올 인지평가 항목에 대한 ±2 SD를 벗어나는 이상치를 제외하고 분석 하였다. 유효성 평가에 영향을 미칠 것으로 판단되는 항목(나이, K-MMSE 등)에 대하여 추가분석을 실시 하였다. 인지기능 검사항목 등을 이용하여 Z score를 산출 하였다.각 유효성 평가 항목의 기저치 및 동질하지 않은 인구학적정보 항목은 covariate 로 보정하여 ANCOVA 를 실시하였다. 2 차 유효성 평가 변수 섭취 전 – 섭취 12 주 후의 청각적 연속수행검사, 언어기억 검사, 시지각작업기억검사, 스트레스 검사, 우울증 척도, 혈중 뇌유래신경영양인자, 항산화지표 변화량에 대해서 섭취군 별로 기술통계량을 제시하고, 시험군과 대조군간 차이에 대하여 independent t test 를 이용하여 분석하였다. 추가적으로, 각 섭취군 별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 청각적 연속수행 검사, 언어기억검사, 시지각작업기억 검사, 스트레스 검사, 우울증 척도, 혈중 뇌유래신경영양인자, 항산화지표 변화 차이는 paired t test 를 이용하여 분석하였따. 또한 청각적 연속수행 검사, 언어기억검사, 시지각작업기억 검사, 스트레스 검사, 우울증 척도, 혈중 뇌유래신경영양인자, 항산화 지표 항목에 대한 ±2 SD 를 벗어나는 이상치를 제외하고 분석 하였다. 유효성 평가에 영향을 미칠 것으로 판단되는 항목(나이, K-MMSE 등)에 대하여 추가분석을 실시 할 수 있다. 인지기능 검사항목 등을 이용하여 Z score를 산출 하였다. 각 유효성 평가 항목의 기저치 및 동질하지 않은 인구학적정보 항목은 covariate 로 보정하여 ANCOVA 를 실시 하였다. 안전성 평가 변수

	인체적용시험 기간 동안 발생한 모든 이상반응에 대하여 전체와 섭취군별로 빈도, 퍼센트로 요약하였다. 섭취군 간 이상반응의 발생 양상을 chi-square test를 이용하여 분석하였다. ◆ 진단검사의학 검사와 활력징후 결과에 대하여 섭취군내 비교와 섭취군간 비교를 실시하였다. 섭취군내 비교의 경우, 기술통계량을 제시하고 평균 변화에 대하여 paired t test 를 이용하여 분석하였다. 섭취군간 비교의 경우, 평균 변화량에 대하여 independent t test 를 이용하여 비교 분석 하였다.
요약 · 결론	본 인체적용시험은 고함유녹차카테킨추출물 섭취가 인지기능 개선에 미치는 효과와 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약 대조 연구이다. 본 인체적용시험의 등록 목표 연구대상자 수는 80명, 중도탈락률 30%를 고려한 종료목표 연구대상자 수는 56 명으로서, 총 102명의 자원자가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝(선별) 검사를 받았고, 연구대상자 적합성평가를 통해 총 80명이 적격 연구대상자로 선정되었다. 선정된 연구대상자는 이중눈가림 방법을 통해 고함유녹차카테킨추출물군과 위약군에 1:1 무작위배정 되어 본 인체적용시험에 참여하였다. 시험자는 모든 연구대상자를 대상으로 시험계획서에 정해진 바에 따라 신경인지기능검사, MoCA-K, 혈중 BDNF, TAS 등 유효성 평가와 진단검사의학 검사를 비롯한 안전성 평가를 시행하였다. 유효성 평가를 위한 주분석군은 계획서 순응연구대상자군(Per Protocol Set)으로써, 중도탈락한 고함유녹차카테킨추출물군의 연구대상자 2명, 병용금지약물을 복용한 연구대상자 2명(고함유녹차카테킨추출물군 40명 중 3명, 위약군40명 중 1명)이 분석에서 제외됨에 따라, 총 76명의 연구대상자를 대상으로

	유효성 평가 분석을 시행하였다. 안전성 평가를 위한 주분석군은 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 연구대상자군(Safety Set)이었다. 1차 유효성 평가 결과, 시각기억검사는 카테킨고함유녹차추출물군과 위약군에서 유의미한 차이가 없었다. (P>0.05) 인체적용시험 참여 기간에 연구대상자들의 생활습관을 평가하기 위해 식이섭취와 신체활동 조사를 하였으며, 계획서순응연구대상자군(Per Protocol Set) 76명을 대상으로 분석 시, 시험군과 위약군의 열량, 거대영양소 및 식이섬유 섭취량, 신체활동량(MET value)에 있어서 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없어서, 연구대상자들이 인체적용시험에 참여하는 동안 일상생활을 일정하게 유지하였음을 알 수 있었고, 식이섭취와 신체활동도가 본 시험 결과에 미치는 영향이 거의 없을 것으로 판단하였다. 안전성 평가를 위해 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 연구대상자 80명(Safety군)을 대상으로 이상반응, 진단검사의학 검사(혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 소변 검사), 활력징후 등의 측정 결과를 분석한 결과, 총 76명의 연구대상자 중 5명의 경도 또는 중등도 이상반응이 발생하였다. 섭취군 간 이상반응 발생 수에 차이가 없었으며(P>0.05), 인체적용시험용제품 섭취와 인과관계가 없는 이상반응으로 임상적 의미가 없다고 판단하였다. 진단검사의학 검사와 활력징후 결과에서도 두 섭취군 간에 의미 있는 변화 또는 차이가 없었다.(P>0.05) ◆ 요약하면, 본 인체적용시험을 통해 노령층 연구대상자에서 고함유녹차

	카테킨추출물 12주 섭취로 시각기억 및 시지각 작업 기억과 같은 인지기능 개선 효과를 확인할 수 없었다. 또한 본 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 고함유녹차카테킨추출물 섭취의 인체 안전성이 확인되었다.

목 차

1. 약어 및 용어의 정의

용어 및 약어	정 의
AE	Adverse Event
ALP	Alkaline Phosphatase
ALT	Alanine Transaminase
ANCOVA	Analysis of covariance
AST	Aspartate Transaminase
BDI	Beck Depression Inventory
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BMI	Body Mass Index
BUN	Blood Urea Nitrogen
CRF	Case Report Form
Gamma-GT	Gamma-glutamyl transferase
GCP	Good Clinical Practice
ICH	International Conference on Harmonization
ID	Identification
IRB	Institutional Review Board
ITT	Intention-to-treat
K-MMSE	Korean Mini-Mental Status Examination
MoCA-K	Korean Version of the Montreal Cognitive Assessment
No	Number
OTC	Over-the-counter
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
PP	Per Protocol
PSS	Perceived stress scale
RBC	Red Blood Cell
SAE	Serious Adverse Event
TAS	Total antioxidant status
WBC	White Blood Cell

2. 윤리적 고려

2.1 인체적용시험 실시기관에서의 인체적용시험시험계획서 심의

인체적용시험계획서는 연구대상자의 안전을 충분히 고려하여 작성되었으며, 전북대학교병원 생명의학연구윤리심의위원회(Institutional Review Board, IRB)가 심의하여 인체적용시험 수행을 결정하였다.

전북대학교병원 생명의학연구윤리심의위원회 최초 승인 일자

: 2018년 10월 17일

2.2 연구대상자 동의

연구대상자에게 인체적용시험의 목적, 내용, 기능성식품의 효과 및 이상반응에 대하여 사전에 충분히 설명한 후, 연구대상자의 자발적 서면동의를 받아 인체적용시험을 진행하였다.

3. 연구자 및 연구지원 조직

3.1 인체적용시험 실시기관

전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터

3.2 시험책임자

전북대학교 의과대학 정신건강의학교실 교수 정영철 M.D., Ph.D.

3.3 공동연구자

전북대학교 의과대학 약리학교실 교수 채수완 M.D., Ph.D.

전북대학교 의과대학 비뇨기과학교실 교수 김영곤 M.D., Ph.D.

전북대학교 의과대학 생화학교실 교수 박병현 M.D., Ph.D.

3.4 시험담당자

전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터

정수진, 정은수, 황지현, 김우림, 장희연, 노순옥, 최재순

전북대학교병원 정신건강의학교실

김광희, 신혜선, 김리나

3.5 관리영양사

전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터

정은수, 김우림, 장희연

3.6 의뢰사

(주)알앤오식품

전라북도 완주군 봉

3.7 임상시험수탁기관(CRO) 또는 모니터 기관

헬스케어크레임스엔드멘내지멘트㈜

전라북도 전주시 덕진구 원장동길 111-18 전라북도생물산업진흥원 본관 103~4호

4. 서론

최근 우리나라는 생활수준의 향상과 의료기술의 발달로 평균수명의 연장과 더불어 노인 인구가 급격히 증가하여 65 세 이상의 노인 인구가 2011 년 약 565 만 명으로 전체 인구의 11%를 차지하고 있다.

연령이 증가하면서 치매 환자는 급속히 늘어나고 65 세가 지나면 그 수는 5 년마다 두배씩 증가한다. 우리나라는 2000 년에 65 세 이상의 노인인구가 전체 인구의 7%를 넘어서 고령화 사회에 진입하였다. 이에 따라 2020 년에는 치매환자도 70 만 명, 2050 년에는 212 만 명이상으로 급격히 늘어나 사회 경제적으로 큰 문제가 될 것으로 예상된다.

치매란 후천적인 뇌질환에 따른 다발성 인지기능 장애가 일상생활이나 사회생활에 어려움으로 초래하는 상태를 말한다. 치매 노인은 기억력, 지남력, 판단력 등 인지 기능 및 일상생활기능이 상실됨에 따라 이전에 가능했던 활동에 주의를 기울이기 어렵고, 행동과 사회 기술의 퇴화가 함께 나타나 대인관계 상 갈등이 야기되어 이것이 대상자를 사회적으로 고립시킨다. 또한 치매는 일단 발병하면 만성적으로 퇴행하면서 완치가 어렵기 때문에 오랜 기간 동안 이환의 고통과 활동 장애로 독립적인 생활능력이 현저히 감퇴되어 주위로부터의 간병 또는 간호를 절실히 요구하게 된다. 노인성 치매에 동반되는 이러한 주요 증상과 특성들은 그동안 노인의 삶의 만족도를 저하시키는 주요 요인으로 논의되어 왔다.

노인 인구가 증가함에 따라 치매 등 인지기능의 저하를 회복시키고자 하는 연구가 다양하게 이루어지고 있으나, 현재까지 개발된 인지기능 개선약물들의 부작용 및 독성이 심각하게 나타나는 경우가 빈번해 논란이 되고 있다.

따라서, 노인의 삶의 만족도를 높이고자 부작용 및 독성이 적은 치료제 연구 및 개발에 노력을 기울여야 한다.

녹차는 산차과(Theaceae)에 속하는 차나무(Camellia sinensis L.) 잎에서 생산된 차엽을 물에 우려내어 마시는 음료로 신라시대 사신 대렴이 당나라에서 차 종자를 가져와 보급된 이후 커피, 코코아와

함께 카페인을 함유한 비알콜성 기호음료로서 아시아를 비롯한 160 여 개 나라에서 널리 음용되어 왔다.

녹차에는 카테킨, 카페인, 아미노산, 섬유소, 펙틴 등과 엽록소 플라보놀 유도체, 안토시안 등의 식물색소 그리고 지질, 수지류, 정유, 비타민 등 다양한 성분이 함유되어 있는데, 특히 caffeine 이나 tea catechins(tannins)등은 약리적 활성 효과가 크다는 연구 결과들이 발표되고 있다.

차엽 중 catechin 류는 물에 가용되는 성분들 중 그 함유량이 비교적 많은 polyphenol 성분으로 (+)-catechin(C), (+)-gallocatechin(GC), (-)-epicatechin(EC), (-)-epigallocatechin(EGC)과 ester 형인 (-)-epicatechin gallate(ECG), (-)-epigallocatechin gallate(EGCG) 등 6 종류로 구성되어 있고, 이 가운데 EGCG 가 주요 구성성분으로 항산화, 항동맥경화 및 암세포 성장억제 작용 활성이 높은 것으로 보고되고 있다. EGCG 로서 가장 강력한 효능을 지닌 것으로 평가되고 있으며 이는 항산화제로 널리 이용되는 비타민 E 보다 25 배, 비타민 C 보다 100 배 더 효능이 있다고 한다.

유사원료로 수행된 비임상시험 및 인체적용시험에서 인지기능, 기억력, 항스트레스 등 개선에 효과가 있는 것으로 보고되었다.

본 신청원료로 수행된 비임상시험(in vitro, in vivo) 결과 인지기능 개선 효과를 확인하였으며,

이에 따라 본 연구를 통해 인체에서 카테킨고함유녹차추출물의 인지기능 개선에 대한 효과를

과학적으로 평가하고자 한다.

5. 인체적용시험 목적

카테킨고함유녹차추출물의 12 주 섭취할때 나타나는 다음 평가항목의 변화를 위약과 비교하여 살펴보고자 하였다.

1 차 목적

시각기억검사(Visual learning test), 몬트리올 인지평가(MoCA-K)로 평가되는 카테킨고함유녹차추출물의 인지기능 개선에 대한 유효성을 위약 섭취와 비교 평가하였다.

2 차 목적

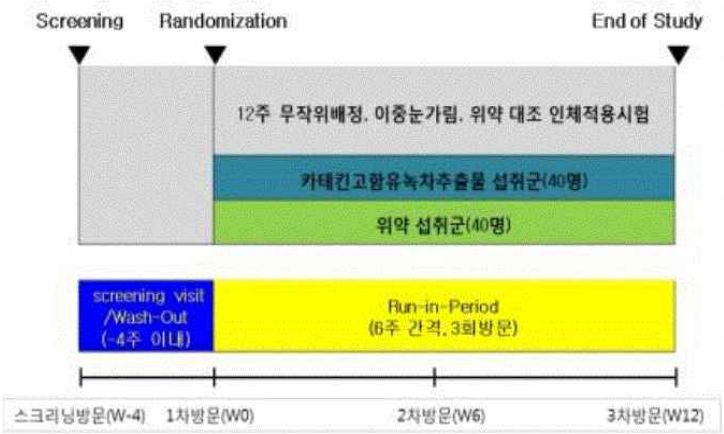
청각적 연속수행 검사(Auditory continuous performance test), 언어기억 검사(Verbal learning test), 시지각작업기억 검사(Visual working memory test), 스트레스 검사(PSS), 우울증 척도(BDI), 혈중 뇌유래신경영양인자(BDNF),항산화지표(TAS)로 평가되는 인지기능개선에 대한 카테킨고함유녹차추출물의 유효성 및 안전성을 위약 섭취와 비교 평가하고자 하였다.

6. 인체적용시험 계획

6.1 인체적용시험 방법

시험자는 서면동의서를 작성한 자원자에 한하여 스크리닝 검사를 시행하여 선정기준에 부합하는 연구대상자로 적합하다고 판단되는 자를 선정하였다. 연구대상자는 스크리닝 방문으로부터 4 주 이내에 1 차 방문하여 연구대상자 선정/제외기준 적합성을 재검토 받은 후 인체적용시험에 등록되었으며, 카테킨고함유녹차추출물군과 위약군에 무작위배정되어 1 차 방문일까지 기초평가(Baseline)을 완료하였다. 이후 인체적용시험용제품을 하루 1 번씩 12 주간 섭취하면서 6 주마다 전북대학교병원 기능성식품임상시험지원센터에 방문하여 유효성평가, 활력징후, 약물투여력 및 의학적상태변화조사, 이상반응조사 등을 수행하였다.

시험자는 인체적용시험용제품 최종 섭취 후 혹은 조기종료 방문 후 필요에 따라 추적 관찰을 실시하였다.



6.2 대조군(대조제품) 선정의 근거

카테킨고함유녹차추출물의 유효성과 안전성을 비교·평가하기 위한 대조제품은 카테킨고함유녹차추출물의 유효성분이 함유되어 있지 않은 위약이다. 동시에 인지기능에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되는 인체에 무해한 식품 성분을 사용하여 카테킨고함유녹차추출물과 중량 및 열량이 거의 동일하게 만들어졌다.

6.3 연구대상자 선정

6.3.1 선정기준

모든 연구대상자는 다음 기준을 만족하여 인체적용시험에 참여하였다.

1) 스크리닝 검사 당시 연령이 만 60 세 이상인 자

2) CERAD-K 의 단어목록기억/회상/재인검사 점수가 정상수치의 1-2 SD 감소한 자(위 3 가지 항목 중 1 항목 이상 만족하는 자)

3) 본 인체적용시험에 대한 자세한 설명을 듣고 완전히 이해한 후, 자의로 참여를 결정하고 주의사항을 준수하기로 서면 동의한 자

6.3.2 제외기준

연구대상자들이 다음 기준 중 하나라도 해당될 경우 인체적용시험의 참여에서 배제되었다.

1) 스크리닝 시 시행되는 정신장애의 진단 및 통계 편람의 구조화된 임상면담인 SCID(Structured Clinical Interview for DSM-IV)에서 축 1 장애로 현재 치료를 받거나 최근 3 년 이내에 치료받은 과거력이 있는 자

2) 최근 3 개월 이내에 알코올 남용이나 의존이 있는 자

3) 임상적으로 유의한 다음의 중증 질환이 있는 자

(간질, 정신지체, 뇌신경계 질환, 내분비계 질환, 혈액·악성종양, 심혈관계 질환, 크론씨 병 등)

4) 진단검사의학검사에서 다음에 해당하는 결과를 보이는 자

☞ AST, ALT > 정상범위 상한치의 3 배

☞ 기타 유의한 진단검사의학검사 소견

5) 첫 섭취일 전 2 주 이내에 어떠한 전문의약품이나 한약을 복용하였거나, 1 주 이내에 어

떠한 일반의약품(OTC) 또는 비타민 제제를 복용한 자

6) 첫 섭취일 전 2 개월 이내에 타 인체적용시험에 참여한 자

7) 첫 섭취일 전 1 개월 이내에 전혈 헌혈을 하였거나, 2 주 이내에 성분헌혈을 한 자

8) 기타 사유로 인하여 연구책임자가 본 인체적용시험 참여에 부적합하다고 판단한 자

6.4 인체적용시험용제품

6.4.1 인체적용시험용제품(용량 및 제형 등)

- 카테킨고함유녹차추출물 및 위약
- 성상 및 제형: 미홍색의 분말(캡슐)
- 사용기간: 24 개월
- 저장방법: 실온보관

성분	함량(%)	
	카테킨고함유녹차추출물(%)	위약(%)
카테킨고함유녹차추출물	68.42	-
결정셀룰로오스	31.38	96.40
카복시메틸셀룰로스칼슘 (붕해촉진제)	0.10	-
이산화규소	0.10	0.10
적색색소	-	3.50
합계	100	100

6.4.2 섭취방법

(1) 1 일 섭취량 및 섭취방법

- 카테킨고함유녹차추출물군: 1 일 1 회, 1 회 1 캡슐, 아침 식후 경구섭취

  (380 mg/day, 카테킨고함유녹차추출물로써 190 mg/day)

(2) 위약군: 1 일 1 회, 1 회 1 캡슐, 아침 식후 경구섭취

(380mg/day, 카테킨고함유녹차추출물로써 0mg/day)

(3) 섭취기간

- 카테킨고함유녹차추출물 또는 위약 제품을 12 주간 경구섭취

6.4.3 섭취군 배정 방법(무작위배정 방법)

무작위배정은 이중눈가림 단계에서 사용되어 연구대상자의 시험군 배정 시 편견을 피하고, 각 시험군마다 알려지거나 미지수인 연구대상자의 특징 (즉, 인구학적 특성과 기초평가일 특성치)이 골고루 균형을 이루며, 시험군 간의 통계적 비교의 유효성을 증가시키기 위함이며, 이중눈가림 섭취는 자료수집 과 시험 종료 시점의 평가에서 잠재적인 편견을 줄이기 위해 사용되었다. 시험기간 동안은 연구자나 연구대상자가 연구대상자의 무작위배정 정보를 알 수 없어야 함으로 무작위배정 코드는 의뢰자가 유지보관하는 것을 원칙으로 하였다. 일반적인 경우 모든 연구대상자들이 시험을 완료하고 자료가 locking 되기 전에는 이중눈가림을 해제해서는 안된다. 이중눈가림을 해제한 경우. 이중눈가림을 해제하게 된 날짜, 시간, 이유를 증례기록서와 근거문서의 적절한 곳에 문서화하였다. 의뢰자로부터 받은 이중눈가림 코드 해제 확인 서류 복사본은 근거문서에 보관하였다.

6.4.4 시험제품의 섭취 용량 설정 근거

※ 신청원료의 제안 섭취량

- 일일섭취량 : 1 mg

- 원재료인 차나무(이명:녹차,다목,Tea,Tea camellia)는 전통적으로 오랫동안 사용되어왔고, 식약처 식품원료목록에 등재되어 있는 사용 가능한 원료이다.
- 당해 원료로 수행한 비임상시험에서, 녹차추출물 20~60 mg/kg 섭취 시 인지기능 개선의 효과를 보였다(인체환산 시 100~300mg/day).

- 녹차는 녹차추출물(카테킨으로서 0.3~1 g/day, 항산화, 체지방 감소, 혈중 콜레스테롤 개선), 고농축녹차추출물(EGCG 로서 300~330 mg/day, 항산화), 녹차추출물(카테킨으로서 0.3~1g/day, 콜레스테롤 개선), 녹차추출물/테아닌 복합물(녹차추출물/테아닌 복합물로서 1,680 mg/day, 기억력 개선), 테아닌등복합추출물(테아닌등복합추출물로서 210 mg/day, 기억력 개선)이 식약처에 고시형 및 개별인정 원료로 인정받았다.
- 따라서 섭취근거 및 선행연구 결과 등을 토대로, 본 연구에서는 카테킨고함유녹차추출물 190mg 을 1 일 섭취량으로 설정하였다.

6.4.5 눈가림

이중눈가림 섭취는 자료수집과 시험 종료 시점의 평가에서 잠재적인 편견을 줄이기 위해 사용된다. 일반적인 경우 모든 연구대상자들이 시험을 완료하고 자료가 locking 되기 전에는 이중눈가림을 해제하지 않았다. 다만, 연구대상자의 섭취상황을 알아야 하는 응급상황일 경우에는 이중눈가림을 해제할 수 있다. 이중눈가림을 해제하게 된 날짜, 시간, 이유를 증례기록서와 근거문서의 적절한 곳에 문서화한다. 의뢰자로부터 받은 이중눈가림 코드 해제 확인 서류 복사본은 근거문서에 보관한다.

6.4.6 과거병력 및 병용치료

1) 과거 병력

연구대상자가 동의서에 서명한 시점에서, 3 년 이내에 가지고 있는 과거 병력은 문진을 통해 확인하였고, 증례기록서의 해당 페이지에 기록하였다.

시험기간 동안 질환이 처음으로 발생하거나 병발질환이 시험기간 동안 악화된 경우에는 이상반응으로 간주하고 증례기록서의 이상반응 페이지에 기록하였다.

1) 병용가능 약물

- 연구대상자가 시험에 참가하기 4 주 이전부터 복용하고 있던 약물 중 본 시

험의 결과해석에 영향을 미치지 않을 것으로 판단되는 병용약물 (제품) 은 시험책임자의 판단 하에 허용하였다.

- 기타 질환 또는 이상반응의 치료를 목적으로 일과성으로 사용되는 약제는 담당의사와 상의를 통하여 병용 투여하였다.
- 시험책임자의 판단 없이 임의로 투약한 약물이 시험의 유효성 평가에 영향을 줄 수 있다고 예상되는 경우 이 연구대상자는 탈락하였다. 투여한 모든 제품 및 투여사유는 반드시 증례기록서에 기재하고 시험책임자가 서명하였다.

2) 병용금지 약물

다음에 열거하는 약물은 시험기간 동안 병용투여를 금지하였다.

- 인지기능에 영향을 미칠 수 있는 약물: 아리셉트, 레미닐, 엑셀론, 에빅사 등
- 인지기능에 영향을 미칠 수 있는 건강기능식품: 참당귀뿌리추출물, 포스타티딜세린, 도라지추출물, L.helveticus 발효물, 참당귀추출분말
- 기억력에 영향을 미칠 수 있는 건강기능식품:홍삼, 은행잎추출물 등
- 기타 시험책임자가 인정하지 않는 제제나 제품

연구대상자의 다른 의학적 증상 치료를 담당하는 의사의 판단에 따라 인체적용시험 기간 중 연구대상자의 치료를 위해 병용금기 약물의 사용이 필요한 경우에 해당 연구대상자는 즉시 인체적용시험이 중단되었으며, 증례기록서의 마지막 페이지에 관련내용을 자세히 기록하였다.

7 인체적용시험 순응도

적용시험용제품의 섭취상황에 대하여 2 차 방문과 3 차 방문(종료 방문)시 연구대상자에게 후 남은 인체적용시험용제품을 지참하고 방문하도록 지도하여 연구대상자가 지참하고

온 인체적용시험용제품의 잔여량을 반납 받고 순응도를 확인하였다. 연구대상자가 지참하고 온 잔여량은 반드시 약국에 반납하여 수불장부를 기록하였다.

6.5 인체적용시험 관찰 항목 · 검사 방법 및 일정

6.5.1 인체적용시험 관찰 항목 · 검사 방법

1) 연구대상자 동의서(Informed Consent Document, ICD)

연구자는 인체적용시험 전반에 걸쳐 연구대상자가 가질 수 있는 질문에 대해 답변하고 연구대상자의 인체적용시험 참여 지속 의사에 중요할 수 있는 새로운 정보가 입수되는 대로 적절한 시한 내에 이를 공유하는 것을 포함하여 연구대상자가 인체적용시험 참여로 인한 위험 및 이익을 이해하도록 확인하는 책임이 있다. ICD 가 새로운 정보에 따라 갱신되는 경우 연구자는 갱신된 ICD 를 사용하여 연구대상자의 인체적용시험 참여 지속 의사를 다시 한번 확인하였다. ICD 는 연구대상자가 인체적용시험에 참여하기 이전에 쉬운 용어를 사용하여 인체적용시험 참여에 따르는 위험 및 이익을 연구대상자에게 설명하기 위해 사용되었으며, 연구대상자가 인체적용시험 참여에 따르는 위험 및 이익에 대해 만족 할 만큼 이해하고 인체적용시험에 참여하고자 하는지 문서화하기 위해 사용되었다.

연구자는 각 연구대상자가 제출한 연구대상자 동의서를 확인할 책임이 있다. 여기에는 모든 인체적용시험계획서 상의 절차 수행 및 시험제품의 섭취 이전에 적절한 서명 및 날짜가 기재되어야 하는 점이 포함되었다.

2) 스크리닝 번호 및 연구대상자 번호 부여

인체적용시험에 참여하고자 서면 동의한 자원자에게 스크리닝 번호를 부여하였다. 스크리닝 번호는 S 로 시작하는 전체 네 자리, 숫자 세 자리로 구성되었으며(S001~), 동의서를 받은 순서대로 부여하였다. 연구대상자 번호 부여방법은 스크리닝 검사를 시행하여 본 인체적용시험의 연구대상자로서 적합하다고 판단되는 자를 선정하였고, 1 차 방문 시

최종통과 되면 통과된 순서대로 무작위배정하여 연구대상자 번호를 부여하였다. 연구대상자 번호는 RNO-R 로 시작하며, 뒤 숫자 두자리로 일정한 규칙을 갖는다. 연구대상자 번호 숫자부분의 의미는 다음과 같다. 첫 번째와 두 번째 숫자는 참여한 연구대상자의 순서를 나타내며 01~80 까지 나타내었다. 각 연구대상자에게 부여된 연구대상자 번호는 인체적용시험이 끝날 때까지 연구대상자를 인식하는 연구대상자식별코드(subject identification code)로 사용되었다.

3) 병력 및 약물 투여력 조사

연구대상자가 동의서에 서명한 시점에서, 3 년 이내에 가지고 있는 과거 병력을 확인하였고, 증례기록서의 해당 페이지에 기록하였다. 인체적용시험기간 동안 질환이 처음으로 발생하거나 병발질환이 시험기간 동안 악화된 경우에는 이상반응으로 간주하고 기록하였다. 또한 모든 병용약물의 일반명, 용량, 용법, 투여기간 등을 상세히 기록하였다.

4) 활력징후

활력징후는 좌위 혈압, 맥박수 항목을 측정하였다. 혈압은 연구대상자의 팔이 심장의 높이에 위치하도록 하여 측정하였으며, 단위는 mm Hg 이고 정수로 표기하였다. 급격한 체위변동 없이 5 분 이상 좌위 자세를 유지한 상태에서 혈압, 맥박수를 측정하였다. 활력징후 측정시기가 채혈시기와 일치할 경우, 가급적 활력징후를 먼저 측정한 후 채혈을 하도록 하였다. 불가피하게 활력징후를 채혈 후 실시할 경우, 가급적 5 분 이상의 간격을 두고 활력징후를 측정하도록 하였다.

5) 신체계측

신장과 체중은 시험기간 중 동일한 기계를 사용하도록 하였다. 신장은 단위를 cm 로 하였으며, 스크리닝 방문시의 측정값으로 연구 종료 시까지 기재하도록 하였으며, 소수점 첫째 자리에서 반올림하여 정수로 표기하였다. 체중은 단위를 kg 으로 하였으며, 소수점 첫째 자리까지 표기하였다(단, 소수점 둘째 자리까지 나오는 기계일 경우, 둘째 자리에서

반올림하여 첫째 자리까지 표기하였다). 체질량지수 (body mass index, kg/m^2)는 체중(단위: kg)을 신장(단위: m)의 제곱으로 나눈 값이며, 소수점 둘째 자리에서 반올림하여 소수점 첫째 자리까지 표기하였다.

6) 진단검사의학 검사

진단검사의학 검사는 12 시간 이상 공복상태에서 채혈하여 측정하는 것을 원칙으로 하되, 시험책임자의 판단에 따라 달리 시행하였으며, 채취된 혈액은 분석 후 폐기한다. 검사 항목은 다음 과 같다.

· 혈액학적 검사: WBC, RBC, Hemoglobin, Hematocrit, Platelets count

· 혈액생화학적 검사: ALP, gamma-GT, AST, ALT, total bilirubin, total protein, albumin, BUN, creatinine, total cholesterol, triglyceride, HDL-C, LDL-C, glucose, CK, LD, hs-CRP

뇨 검사: speicific gravity, pH, WBC, nitrite, protein, glucose, ketone body, urobilinogen, bilirubin, Occult blood

· 스크리닝 전 최근 1 개월 이내의 심전도 및 진단검사의학 검사 결과로 대체할 수 있었다. 추가로 필요한 진단검사의학 검사항목은 해당 인체적용시험 스크리닝 방문일에 검사하였다.

7) 간이정신상태검사 도구(K-MMSE; Korean Mini-Mental State Examination)

치매의 조기진단과 변별진단을 위해 개발된 검사로 외국의 MMSE 검사(Folstein MF 등, 1975)를 우리나라 특성에 맞게 개발하였다. 시간 지남력(5 점), 장소 지남력(5 점), 기억등록(3 점), 주의집중 및 계산능력(5 점), 기억회상 (3 점), 언어 및 실행능력(6 점), 시공간구성능력(1 점), 이해 및 판단능력(2 점) 항목으로 구성되어 있다. 총 30 점 만점이며, 무학이면서 시간 지남력과 언어항목에서 만점이 아닌 경우 1 점씩 가산하고, 주의집중 및 계산 항목에 서 만점이 아닌 경우 최고 2 점까지 가산하여 채점하였다.

8) 시각기억검사(visual learning test), 시지각작업 기억(visual working memory test) 및 언어기억검사(verbla learning test), 청각적 연속수행 검사(Auditory continuous perfor mance test)

CNT(전산화신경인지검사) 중 시각기억검사(visual learning test) 및 언어기억검사(verbal learning test)과 청각적 연속수행 검사(Auditory continuous performance test)과 WMT(작업기억과제) 중 시지각작업 기억(visual working memory test)을 측정하였다.

9) 몬트리올 인지기능 평가(MoCA-K)

MoCA-K 를 이용한 인지기능 평가는 총 8 개 항목으로 시공간/실행력, 어휘력, 기억력, 주의력, 문장력, 추상력, 지연 회상력, 지남력과 같은 인지기능을 평가하였다. 실행시간은 10 분가량 소요되며, 만점은 30 점이며, 23 점 이상이면 정상으로 간주하였다. 학력이 6 년 이하면 1 점을 더하였다.

10) 스트레스 검사(PSS)

스트레스를 느끼는 정도를 평가하는데 가장 널리 사용되는 도구로서, 1983 년 Cohen 등에 의해 개발된 척도로서 외국의 스트레스자각척도 검사를 우리나라 특성에 맞게 한글판 스트레스 자각척도로 개발하였다. 한글판 스트레스자각척도는 이종하 등(2012)의 연구를 통해 국내표준화 연구 신뢰도, 타당도에 대한 검증이 이루어졌다. 스트레스가 얼마나 예측불가능한지, 얼마나 조절불가능한지, 얼마나 감당하기 어려운지를 평가할 수 있는 문항으로 구성되어 있으며 총 10 개 문항이다. 각 문항마다 0 점(전혀 없었다)에서 4 점(매우 자주 있었다)까지 평가되며 4 개 문항(4, 5, 7, 8 번)은 역채점하여 나머지 문항과 합산한다. 현재 경험하고 있는 스트레스 상황이나 기분변화를 반영하는 것으로 시행 전 최근 한달 동안이라는 기간을 제시 하였다.(기간이 길어질 경우 예측 타당도가 떨어짐). 최소 중학교 교육을 받은 사람에게 사용되도록 만들어졌으며 질문들이 비교적 어느 특정 대상에 해당되지 않도록 일반적인 내용으로 구성되었

다.

11) 우울증 척도(BDI)

우울증 척도(BDI)는 전세계적으로 가장 많이 사용되는 자기보고형 척도로 임상 현장에서 환자를 진단하거나 치료 효과를 평가하는데 뿐만 아니라 일반 인구에서 우울증의 가능성이 있는 사람을 선별하거나, 연구목적으로 피험자를 선발하는 도구로서 흔히 이용된다. 우울증의 인지적, 정서적, 동기적, 신체적 증상 영역을 포함하는 21 문항으로 이루어져 있으며, 각 문항마다 0~3 점으로 총점의 범위는 0 점에서 63 점이다. BDI 점수 0~9 점을 비우울, 10~15 점을 경도의 우울증, 16~23 점을 중등도의 우울증, 24~63 점을 심한 우울증으로 분류한다.

12) 혈중 뇌유래신경영양인자(BDNF; Brain-Derived Neurotrophic Factor)

혈중 뇌유래신경영양인자(BDNF) 검사를 위해 5 mlSST tube 에 채혈 후, 가볍게 전도 혼합하여 30 분간 standing 후 즉시 3000 rpm 에 10 분 동안 원심분리한 후 분리된 상층액 중 일부를 microtube 에 옮겨 냉동보관 후 위탁기관에 분석 의뢰한다. 채취된 혈액은 분석기관에서 직접 수거하여 분석 후 폐기한다.

13) 항산화지표(TAS) 검사

항산화지표 검사를 위해 혈액채취는 5 ml 용 SST tube 1 개에 5 ml 채취하였고, Clotting 하기 위하여 30 분간 실온에 방치 한 후 3000 rpm(or 2000 xg)에 10 분 동안 원심분리하였다. 분리된 혈청을 1.5 ml tube 1 개에 0.5 ml 을 옮긴 후 냉동(-70℃)에 즉시 보관 한 후 분석기관에 의뢰하였다. 채취된 혈액은 분석 후 폐기하였다.

14) 추가분석을 위한 혈액 수집

카테킨고함유녹차추출물은 세포시험 및 동물시험에서 인지기능 개선 효능이 확인되었다. 따라서 유효성 평가항목 외에 인지기능 관련 지표(tau protein, β-amyloid 등)를 추가적으로 분석할 수 있음에 따라 샘플을 수집 · 보관 후 분석한다. 본 연구의 유효성 및 안전성 평가항목

분석 후 시험책임자의 판단 또는 학술발표에의 활용 등에 의해 분석 여부를 판단한다.

혈액 수집을 위해 3 ml 의 혈액을 채취하여 실온에 방치 후 3000 rpm 에서 10 분 동안 원심분리하여 plasma 1 ml 과 혈소판 포함한 cell pellet 을 얻어 초저온 냉동저장(-70℃)한다. 수집된 샘플은 분석 후 즉시 폐기 또는 연구대상자가 인체유래물 연구동의서에 명시한 보존기간에 따라 보존하며, 보존기간이 지난 인체유래물은「폐기물관리법」제 13 조에 따른 기준 및 방법에 따라 폐기한다.

15) 식이섭취조사

식이섭취조사는 식이기록법에 따르며 연구대상자는 1 차, 3 차 방문 전 평일에 하루 동안 섭취한 음식물을 모두 작성하고, 시험자는 식이기록지를 회수하여 식이섭취 분석을 시행한다.

16) 신체활동 조사

연구대상자는 1 차, 3 차 방문 시 세계신체활동설문(Global Physical Activity Questionnaire: GPAQ)에 의한 신체활동조사 설문지를 작성하였다.

17) 연구대상자 이상반응 모니터링

이상반응에 대한 정보는 수시로 연구대상자에게 자발적인 보고를 하도록 하며, 그 외에 투약기간 동안 전화 방문과 정기 방문 시 시험담당자의 면담 및 문진 등 진료를 통하여 확인하였다. 이상반응 조사에는 발현일 및 소실일, 이상반응의 정도 및 결과, 인체적용시험용제품과 관련하여 취해진 조치 및 인체적용시험용제품과의 인과관계, 인체적용시험용제품 이외 의심되는 약제명, 이상반응에 대한 치료여부 및 내용 등이 포함되었다.

18) 선정기준/제외기준 확인 (연구대상자 적합성 평가)

스크리닝 방문 시에 연구대상자 동의여부와 인구학적 조사, 병력 및 약품 투여력 조사, 이학적 검사소견, 심전도, 기타 검사결과를 종합하여 선정기준/제외기준에 합당하는 연구대상자

선정이 이루어졌는지 평가하여 기록하였다.

19) 무작위 배정 및 인체적용시험용제품 처방

선정기준/제외기준에 합당한 연구대상자를 카테킨고함유녹차추출물군 또는 위약군으로 무작위 배정하였다. 무작위배정은 선정기준/제외기준 평가일인 1 차 방문에 이루어지며, 이때에 최초 섭취가 이루어졌다. 이후 섭취시작 6 주, 12 주에 연구대상자가 방문하여 인체적용시험용제품을 제공 및 반납하도록 하였다.

6.5.2 인체적용시험 관찰 항목 진행 일정

1) 스크리닝 방문 (-4 주)

이 인체적용시험에 참가하도록 선택된 연구대상자는 시험에 대한 설명을 듣고 다음 순서에 따라 평가를 받았다.

① 연구대상자를 시험에 참여시키기 전에 시험 과정을 설명하고, 연구대상자에게 서면 동의서를 받았다.

② 연구대상자는 순서대로 스크리닝 번호를 지정받았다.

③ 연구대상자의 인구학적 정보와 병력(외과적 수술력을 포함한 과거력 및 현병력) 및 약물 투여력을 조사/기록하였다.

④ 음주/흡연력을 조사하였다.

⑤ 신체검진, 활력징후(혈압 및 맥박수), 신체계측을 실시한다.

⑥ K-MMSE 검사를 실시하였다.

⑦ 선정/제외기준을 만족시키지 못하는 연구대상자를 대상으로 이후 계획된 검사를 실시하지 않았다.

⑧ 혈중 뇌유래신경영양인자, 항산화 지표 검사를 실시한다.

⑨ 추가분석을 위한 혈액 수집을 실시한다.

⑩ 진단검사의학 검사, 심전도를 실시하였다.

⑪ 다음 방문일을 지정하였다.

1) 1 차 방문 (0 주)

1 차 방문은 스크리닝 방문일 이후에 이루어졌으며, 다음의 항목을 평가하였다.

① 약물투여력 및 의학적 상태변화 확인하였다.

② 활력징후(혈압 및 맥박수)를 실시하였다.

③ 연구대상자 선정/제외기준을 최종평가하고, 무작위배정을 실시하였다. 단, 선정/제외기준 최종평가에 통과하지 못한 자는 이후 계획 된 검사를 실시하지 않았다.

④ 시각기억검사, 청각적 연속수행검사, 언어기억검사, 시지각작업 기억 검사 몬트리올 인지평가 실시하였다.

⑤ 스트레스 검사, 우울증 척도 검사를 실시한다.

⑥ 식이섭취조사 및 신체활동조사를 실시한다.

⑦ 인체적용시험용제품섭취방법에 대하여 교육을 하고, 인체적용시험제품을 제공한다.

⑧ 다음 방문을 지정해 준다.

2) 2 차 방문 (6 주)

인체적용시험용제품의 최초 섭취 이후 6 주째에 2 차 방문이 이루어졌으며, 다음의 항목을 평가하였다.

① 약물투여력 변화를 확인하였다.

② 활력징후(혈압 및 맥박수)를 실시하였다.

③ 연구대상자로부터 남은 인체적용시험용제품을 회수하여 갯수를 확인하고 순응도를 평

가하였다.

④ 인체적용시험용제품섭취방법에 대하여 교육을 하고, 인체적용시험용제품을 제공하였다.

⑤ 이상반응 발생유무를 확인하였다.

⑥ 다음 방문일을 지정하였다.

3) 3 차 방문 (12 주; 시험 종료 방문)

인체적용시험용제품의 최초 섭취 이후 12 주째에 3 차 방문이 이루어졌으며, 다음의 항목

을 평가하였다.

① 약물투여력 변화를 확인하였다.

② 음주/흡연력을 조사하였다.

③ 신체검진, 활력징후(혈압 및 맥박수), 신체계측을 실시한다.

④ 시각기억검사, 청각적 연속수행검사, 언어기억검사, 시지각작업 기억 검사, 몬트리올 인지평가를 실시하였다.

⑤ 스트레스 검사, 우울증 척도 검사를 실시하였다.

⑥ 혈중 뇌유래신경영양인자, 항산화 지표 검사를 실시한다.

⑦ 추가분석을 위한 혈액 수집을 실시한다.

⑧ 진단검사의학 검사, 심전도 검사를 실시한다.

⑨ 식이섭취조사 및 신체활동조사를 실시한다.

⑩ 연구대상자로부터 남은 인체적용시험용제품을 회수하여 갯수를 확인하고 순응도를 평가하였다.

⑪ 이상반응 발생유무를 확인하였다.

⑫ 필요한 경우 연구대상자에게 다음 방문일을 지정하였다.

6.6 자료의 질 보증

인체적용시험 자료의 정확성 및 신뢰성을 보증하기 위한 조치로는 적합한 자격요건을 가진 인체적용시험자와 시험기관을 선정하여 인체적용시험이 실시되기 이전에 인체적용시험자 및 담당자에 의한 인체적용시험계획서의 검토, 인체적용시험 의뢰자에 의한 주기적인 시험기관 모니터링 방문, 검사실로부터 얻은 인체적용시험 자료들을 인체적용시험 의뢰자에게 자료파일로 전송하는 일등이 포함되었다. 혈액, 혈청 및 소변 샘플의 수집, 준비와 운송에 대한 서면으로 된 지시사항이 제공되었다. 인체적용시험 시작 전에 증례기록서 완성지침이 제공되고, 인체적용시험 담당자들 사이에서 검토되었다. 인체적용시험 의뢰자는 시험기관 방문 동안, 그리고 증례기록서가 의뢰자에게 회수된 후에 증례기록서의 정확성과 완결성을 검토되었다. 내용이 일치하지 않을 때에는 인체적용 시험자 또는 담당자와 함께 적절한 방법으로 해결하였다. 자료는 인체적용시험 데이터베이스로 보내져 정확성을 확인 받았다.

6.7 인체적용시험계획서의 통계적 분석방법 및 연구대상자 수

6.7.1 통계분석 계획

본 인체적용시험의 연구대상자로부터 얻어진 자료는 크게 Safety 군, ITT (Intent-to-treat)군과 PP (per protocol)군으로 분석하였다.

- Safet 군은 인체적용시험에 참여하여 최소한 1 회 이상 인체적용시험용
- 제품을 섭취한 연구대상자를 대상으로 분석하였다.
- ITT 군은 연구대상자 번호를 부여 받은 연구대상자를 대상으로 하였다.
- PP 군 분석은 ITT 군에 포함되는 연구대상자 중 인체적용시험계획서에 따라

인체적용시험을 완료한 연구대상자를 대상으로 하였다. 중대한 인체적용시험계획서 위반사항은 다음과 같다.

- 선정/제외기준 위반
- 복약 순응도 기준(70% 이상)을 만족하지 못하는 경우
- 무작위배정 위반
- 병용금지약물의 복용
- 기타 중대한 인체적용시험계획서 위반사항이 발생한 경우

• 유효성 평가에 대한 자료는 PP 군을 주 분석대상으로 하되, ITT 군을 추가적으로 분석하여 유효성을 평가하였다. 안전성 평가에 대한 자료는 Safety 군에 대해 분석하여 본 인체적용시험용제품에 대한 안전성을 평가하였다.

1) 유효성평가

1 차 유효성 평가 변수

섭취 전 – 섭취 12 주 후의 시각기억 검사, 몬트리올 인지평가 변화량에 대해서 섭취군별로 기술통계량을 제시하고, 시험군과 대조군간 차이에 대하여 independent t-test 를 이용하여 분석한다. 추가적으로, 각 섭취군 별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 시각기억검사, 몬트리올 인지평가 변화 차이는 paired t-test 를 이용하여 분석한다. 또한 시각기억 검사, 몬트리올 인지평가 항목에 대한 ±2 SD 를 벗어나는 이상치를 제외하고 분석할 수 있다. 유효성 평가에 영향을 미칠 것으로 판단되는 항목(나이, K-MMSE 등)에 대하여 추가분석을 실시할 수 있다. 인지기능 검사항목 등을 이용하여 Zscore 를 산출할 수 있다. 각 유효성 평가 항목의 기저치 및 동질하지 않은 인구학적정보 항목은 covariate 로 보정하여 ANCOVA 를 실시할 수 있다.

2 차 유효성 평가 변수

섭취 전 – 섭취 12 주 후의 청각적 연속수행 검사, 언어기억 검사, 시지각작업기억검사,스트레스검사,우울증척도,혈중 뇌유래신경영양인자, 항산화지표 변화량에 대해서 섭취군 별로 기술통계량을 제시하고, 시험군과 대조군간 차이에 대하여 independent t-test 를 이용하여 분석한다. 추가적으로, 각 섭취군별로 섭취 전 대비 12 주 시점의 청각적 연속수행 검사, 언어기억검사,시지각작업기억검사,스트레스검사,우울증척도,혈중뇌유래신경영양인자, 항산화 지표 변화 차이는 paired t- test를 이용하여 분석한다. 또한 청각적 연속수행 검사, 언어기억 검사,시지각작업기억검사,스트레스검사,우울증척도,혈중뇌유래신경영양인자, 항산화 지표 항목에 대한 ±2 SD 를 벗어나는 이상치를 제외하고 분석할 수 있다. 유효성 평가에 영향을 미칠것으로 판단되는 항목(나이, K-MMSE 등)에 대하여 추가분석을 실시할 수 있다. 인지기능 검사항목 등을 이용하여 Z score 를 산출할 수

있다. 각 유효성 평가 항목의 기저치 및 동질하지 않은 인구학적정보 항목은 covariate 로 보정하여 ANCOVA 를 실시할 수 있다.

2) 안전성평가

- 이상반응

인체적용시험 기간 동안 발생한 모든 이상반응에 대하여 전체와 섭취군 별로 빈도, 퍼센트로 요약하였다. 섭취군 간 이상반응의 발생 양상을 chi-square test 또는 Fisher's exact test 를 이용하여 분석하였다.

- 진단검사의학 검사, 활력징후

진단검사의학 검사와 활력징후 결과에 대하여 섭취군내 비교와 섭취군간 비교를 실시하였다. 섭취군내 비교의 경우, 기술통계량을 제시하고 평균 변화에 대하여 paired t test 를 이용하여 분석하였다. 섭취군간 비교의 경우, 평균 변화량에 대하여 independent t test 를

이용하여 비교 분석하였다.

6.7.2 연구대상자 수

1) 연구대상자 수

본 인체적용시험에는 총 80 명 (각 군당 40 명)의 연구대상자가 무작위배정 되어 시험을 실시하였다. 연구대상자 수 80 명은 30%의 탈락률을 고려한 것이며, 실제로 56 명 (각 섭취군 당 28 명)의 연구대상자가 본 인체적용시험을 중대한 위반 없이 완료할 것으로 예상하였다.

2) 연구대상자 수 산정 근거

본 인체적용시험의 목적은 카테킨고함유녹차추출물에서 섭취에 의한 인지기능 개선효과가 위약 섭취와 비교하여 차이가 있음을 증명하고자 함이다.

본 인체적용시험에서는 연구대상자 수를 산출하기 위하여, 카테킨고함유녹차추출물 12 주 후 몬트리올인지평가 변화량은 0.6, 위약군은-0.7,카테킨고함유녹차추출물군과 위약군의 표준편차는 1.7 로 가정하였다. 위의 가정에 의해 본 인체적용시험의 연구대상자수를 다음과 같이 산출하였다.

(1) 5% 유의수준에서 제 2 종 오류는 0.2 로 하여 80% 검정력을 유지한다

(α = 0.05, β = 0.2, 검정력 = 80%).

(2) 카테킨고함유녹차추출물군과 위약군의 시험예수 비율은 1:1 로 한다(k = 1).

(3) 기초 평가로부터 시험 종료시점에 이르기까지 카테킨고함유녹차추출물군(μt)에서 0.6, 위약군(μc)은 0.7 으로 가정하였다(d=1.3).

(4) 카테킨고함유녹차추출물군과 위약군의 표준편차 (σt)는 1.7 로 가정하였다.

이를 검정하기 위한 가설은 다음과 같다.

H0 : μ t = μ c

H1 : μ t ≠ μ c

위의 (1)-(4)을 가정했을 때 인체적용시험에 필요한 연구대상자 수는 다음과 같다.

$$n_C = \frac{(1+1/k)\sigma^2(Z_{\alpha/2}+Z_{\beta})^2}{d^2} = 28$$

위의 계산으로부터 필요한 연구대상자 수를 산출하고 중도 탈락률 30%를 고려하여 다음 식에 의하여 인체적용시험에 필요한 최종 연구대상자 수를 산출하였다.

$$n = \frac{n_t}{1-r} = 40$$

각 군당 40명의 연구대상자 수가 산출되었으며, 카테킨고함유녹차추출물군:

위약군 배정비를 1:1 로 하여, 카테킨고함유녹차추출물군 40 명, 위약군 40 명이며,

두 시험군을 통틀어 요구되는 연구대상자의 총 연구대상자 수는80명이다.

6.8 인체적용시험 수행 및 분석방법의 변경

인체적용시험 수행 중 몇몇 항목에 대하여 최초 승인된 계획서로부터 변경사항이 있었으나, 인체적용시험 진행 및 결과에 영향을 줄 정도의 중대한 사항은 없었다.

6.9 이상반응을 포함한 안전성의 평가 기준, 평가 방법 및 보고 방법

6.9.1 안전성 관련 용어의 정의

- 이상반응의 정의

이상반응 (Adverse events)은 인체적용시험용제품을 섭취한 연구대상자에게 일어나는 모든 원

하지 않은 의학적 사건이다. 이상반응은 반드시 인체적용시험용제품과 인과관계를 필요로 하지는 않는다. 따라서 이상반응은 인체적용시험용제품과의 관련여부와 상관없이 인체적용시험용제품의 섭취와 일시적으로 관련된 바람직하지 못하고 의도되지 않은 모든 징후 (비정상적인 결과 포함), 증상 또는 질환이 될 수 있다. 여기에는 새로 발생하거나 또는 기초평가일 상태와 비교하여 발현 정도 또는 발현 횟수가 악화되는 것, 실험실적 검사이상을 포함한 비정상적 진단결과의 관찰도 포함된다.

• 중대한 이상반응의 정의

ICH (International Conference on Harmonization)에 의해 내려진 중대한 이상반응의 정의는 다음과 같다:

- 사망하거나 생명에 대한 위험이 발생한 경우
- 입원할 필요가 있거나 입원기간을 연장할 필요가 있는 경우
- 영구적이거나 중대한 장애 및 기능 저하를 가져온 경우
- 태아에게 기형 또는 이상이 발생한 경우
- 위의 사례 외에 약물 의존성이나 남용의 발생 또는 혈액 지로한 등 그 밖에 의학적으로 중요한 상황이 발생하는 사례

위에 열거된 상황 이외의 경우에도 신속한 보고가 필요한지 여부를 판단하기 위해 의학적·과학적 판단을 해야 한다. 예를 들어, 즉각적으로 연구대상자의 생명을 위협하지 않으며 사망 또는 입원을 유발하지는 않으나, 연구대상자의 상태를 악화시키고 또는 위의 정의에서 명시된 상황을 예방하기 위한 개입이 요구될 수 있다. 어떠한 이상반응이 상당히 유의한 임상적 영향을 갖는 임상징후나 증상과 연관되는 것으로 시험책임자에 의해 판단되는 경우 중대한 이상반응으로 여겨진다.

6.9.2 평가 기준

이상반응의 중증도 (Severity) 평가

1 = 경증 (Mild)	연구대상자가 거의 느끼지 못할 정도로 정상적인 일상생활(기능)을 저해하지 않는 정도. 대부분 치료가 필요하지 않는 정도
2 = 중등증 (Moderate)	연구대상자가 불편감을 느낄 수 있으며, 정상적인 일상생활(기능)을 저해하는 정도. 연구대상자가 시험을 계속할 수는 있으나 치료가 필요할 수도 있는 정도
3 = 중증 (Severe)	연구대상자가 매우 불편하여 일상생활(기능)이 불가능 하고, 시험의 계속적인 참여가 불가능한 정도. 치료나 입원이 필요할 수 있는 정도

6.9.3 이상반응의 인과관계(relationship) 평가

명확히관련이있음 (Definitely related)	- 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우 - 이 인체적용시험용 식품 섭취가 다른 어떤 이유보다 가장 개연성 - 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우 - 이 인체적용시험용 식품 섭취와 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우 - 이상반응이 다른 가능성 있는 원인들과 같은 수준으로 본제에 기인한다고 판단되는 경우 - 섭취중단으로(실시된 경우) 이상반응이 사라지는 경우 있게 설명되는 경우 - 섭취 중단으로 이상반응이 사라지는 경우 - 재섭취(Rechallenge, 가능한 경우에만 실시) 결과가양성인경우 - 이상반응이 이 인체적용시험용식품 또는 동일계열의 이 식품에 대해 이미 알려져 있는 정보와 일관된 양상을 보이는 경우
관련이있다고생각됨 (Probably related)	- 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우 - 이 인체적용시험용 식품섭취와 이상반응 발현의 시간적 순서가 타당한 경우 - 이상반응이 다른 원인보다 이 인체적용시험용 식품섭취에 의해 더욱 개연성 있게 설명되는 경우 - 섭취중단으로 이상반응이 사라지는 경우
관련이있을	- 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 있는 경우 - 이 인체적용시험용 식품 섭취와 이상반응 발현의 시간적

가능성이있음 (Possibly related)	순서가 타당한 경우 - 이상반응이 다른 가능성 있는 원인들과 같은 수준으로 본제에 기인한다고 판단되는 경우 - 섭취중단으로(실시된 경우) 이상반응이 사라지는 경우
관련이없다고 생각됨 (Probably Not related)	- 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 없는 경우 - 이상반응에 대해 보다 가능성 있는 다른 원인이 있는 경우 - 섭취중단결과(실시된 경우)가 음성이거나 모호한 경우
명확히관련이 없다고생각됨 (Definitely not related)	- 이 인체적용시험용 식품을 섭취하였다는 증거가 없는 경우 - 이상반응에 대해 가장 개연성 있게 설명되는 다른 어떤 이유가 있는 경우 - 섭취중단결과(실시된 경우)으로 이상반응이 소실되지 않는 경우
불명(Unknown)	-

6.9.4 이상반응과 관련해서 취해진 조치(Action Taken)

0	취해진 조치 없음 (No action taken)
1	인체적용시험용제품의 일시적 섭취 중단 (Study product temporarily interrupted)
2	인체적용시험용제품의 섭취 중단 (Study product permanently discontinued)
3	치료약물 병용 투여 (Concomitant medication taken)
4	비약물치료 (Non-drug therapy given)
5	입원 / 입원 기간의 연장 (Hospitalization / Prolonged hospitalization)

6.9.5 중대한 이상반응, 이상약물반응의 보고

- 인체적용시험의뢰자의 책무: 의뢰자는 명시되지 않은 제품 섭취와 관련된 모든 중대한 이상반응을 시험책임자에게 보고하여야 한다.
- 연구책임자/담당자의 책무: 시험 중 발생한 모든 중대한 이상반응은 연구책임자/담당자에 의해서 인지된 후 24시간 이내에 해당 의뢰자의 연락 담당자에게 보고한다. 중대한

이상반응은 중대한 이상반응 보고서 양식을 통해 의뢰자 (필요한 경우 IRB)에게 전달되며, 이는 연구담당자에 의해 서명된다. 중대한 이상반응의 첫 보고는 이메일, 팩스나 전화로 하며, 전화 보고 이후 중대한 이상반응에 대한 보고는 당일 근무일 이내에 연구담당자에 의해서 중대한 이상반응 보고서 양식을 작성/완료하여 전송한다.

- 시험종료 시까지 해결되지 않거나, 연구대상자의 연구 참여 중단으로 해결되지 않은 모든 중대한 이상반응은 다음과 같이 될 때까지 추적조사를 실시해야 한다:
  - 이상반응의 회복
  - 이상반응의 안정화
  - 기초평가일 상태로 회복
  - 인체적용시험용제품 또는 인체적용시험 실시 이외의 다른 사항에서 기인한 것으로 판단되는 경우
  - 추가적 정보를 얻을 수 없는 가능성이 높을 경우

6.9.6 이상반응의 추적 관찰

연구책임자는 시험 시작일로부터 시험 종료 후 30일 이내까지 발생한 이상반응을 보고한다. 중대한 이상반응의 기준을 만족시키는 이상반응은 중대한 이상반응보고서 양식"을 사용하여 보고하였다. 연구대상자가 시험을 완료 (추적관찰 포함)한 후 30일 이내에 연구자에게 자발적으로 보고하는 중대한 이상반응도 위와 같이 보고한다. 의뢰자는 인체적용시험계획서에 제시된 기간을 경과한 후 연구자가 보고하는 안전성 정보에 대해서도 평가한다.

6.9.7 이상반응의 기록

이상반응의 심각성, 발현 정도 또는 섭취제품과의 연관성과 관계없이 모든 이상반응은 근거문서와 증례기록서에 의학적 용어로 기록되었다. 징후 및 증상이 일반적인 병인에서 기인할 때 가능한 경우 이에 대한 진단이 실시되었다. 연구자는 증례기록서에 이상반응과 인체적용시험용제품 투여 사이의 관련성에 관한 소견을 기록하였다. 이상반응 관리를 위해

요구되는 모든 측정 방법들은 의뢰자의 지시사항에 따라 근거문서에 기록되었다.

7. 연구대상자

7.1 연구대상자의 인체적용시험 참여 실태

본 인체적용시험의 등록목표 연구대상자 수는80명, 30% 탈락률을 고려한 종료목표 연구대상자 수는 56명으로, 총 102명의 자원자(잠재적 연구대상자)가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 받았고, 연구대상자 적합성 평가를 통해 총 80명이 적격 연구대상자로 선정되었다. 선정된 연구대상자는 무작위배정, 이중눈가림 방법을 통해 본 인체적용시험에 참여하였다. 총 80명의 연구대상자 중 2명이 인체적용시험 참여 도중 중도탈락하고, 2명의 연구대상자가 병용금지약물복용에 해당하였다. 유효성 평가를 위한 주분석군을 계획서순응연구대상자군 (Per Protocol Set)으로 정한 프로토콜(시험계획서)에 따라 순응도 미달과 병용금지약물 복용으로 발생한 대상자를 제외한 76명을 대상으로 유효성 평가 분석을 시행하였다(Table 1, Figure 1).

Table 1. 탈락현황 및 사유

섭취군 / 중도탈락 사유	녹차카테킨추출물 (Test group)	플라세보군 (Placebo group)	전체 (Total)
동의철회	2	0	2
병용금지약물 복용	1	1	2
전체	3	1	4

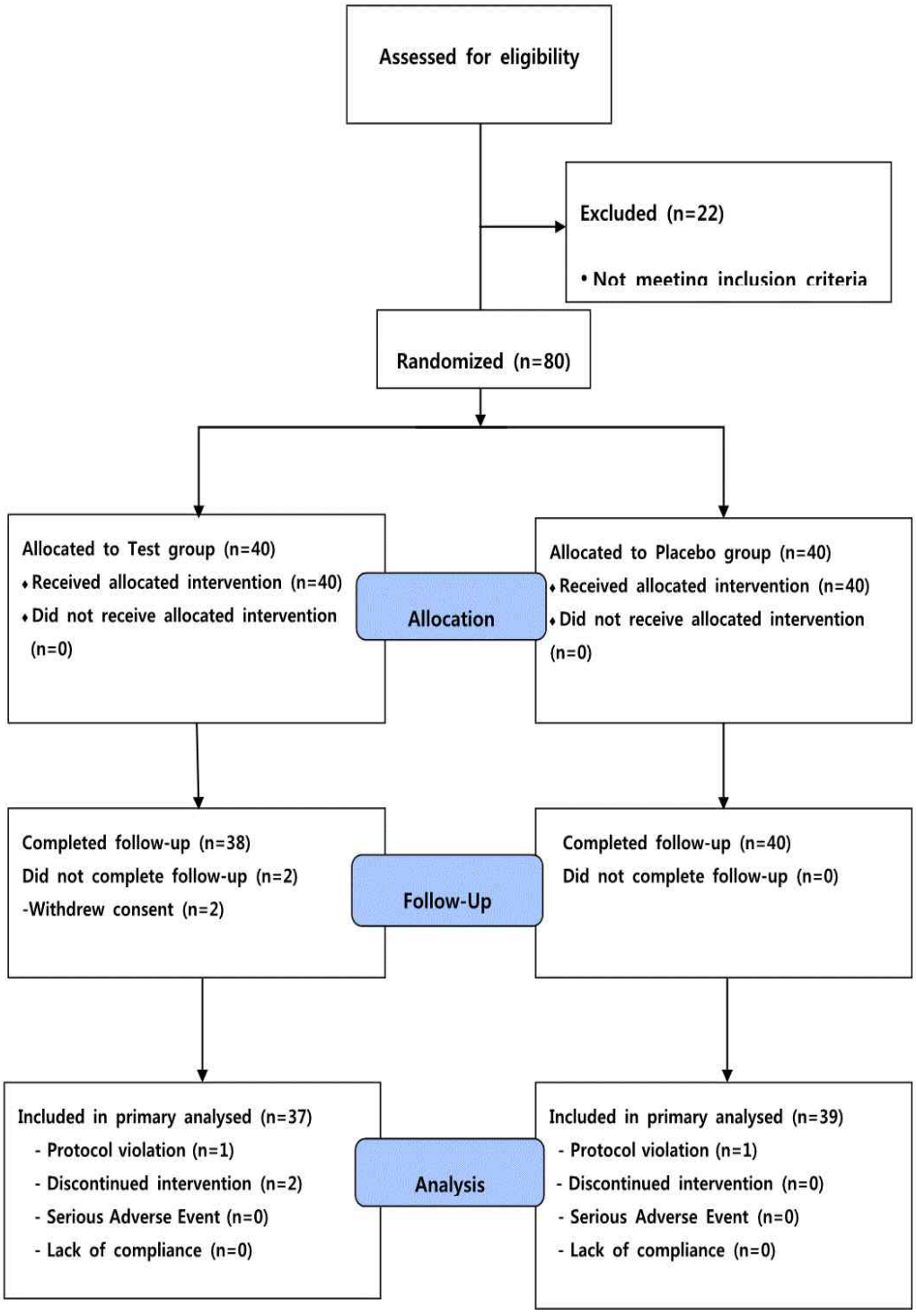


Figure 1. 연구대상자 참여 실태

7.2 연구대상자 인구학적 정보 등

본 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 복용한 연구대상자, 즉 Safety군 80명을 대상으로 인구학적 정보를 분석하였으며, 연구대상자의 자세한 인구학적 정보를 Table 2에 요약하였다.

스크리닝 당시 전체 연구대상자 80명의 평균 연령은70.66±4.66세이고, 성별은 남성이21명, 여성이59명으로 섭취군 간 평균 연령 및 성별 분포에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

평균 신장은 157.98±7.87 cm, 체중은61.33±9.20 kg, 평균 체질량지수는24.59±3.43 kg/m2, 수축기혈압 131.91±12.59 mmHg, 이완기혈압 79.03±9.08 mmHg, 맥박수 75.31±10.03분당 회로 섭취군 간 평균 신장, 체중 및 체질량지수, 활력징후에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

전체 연구대상자의 음주량은 1.20±4.98 unit/주, 평균 흡연량은 하루0.13±1.12 개비로 두 섭취군 간 음주 및 흡연량에 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

전체 연구대상자의 K-MMSE는 26.55±1.05점으로 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

이상의 결과를 종합할 때 전체 연구대상자의 무작위배정이 비교적 잘 이루어졌다고 판단하였다.

Table 2. 연구대상자의 인구학적 특성

	녹차추출물(n=40)	위약군(n=40)	전체(n=80)	*P*-value[1)]
성별(남/여)	10(12.5)/30(37.5)	11(13.8)/29(36.3)	21(26.3)/59(73.8%)	0.799[2)]
학력(년)	9.53±2.92	10.20±2.92	9.86±2.92	0.304
나이(세)	70.98±4.35	70.35±4.98	70.66±4.66	0.552
음주력(unit/주)	1.36±5.58	1.03±4.35	1.20±4.98	0.768
흡연력(개피/day)	0.25±1.58	0.00±0.00	0.13±1.12	0.323
수축기혈압(mmHg)	132.93±11.72	130.90±13.48	131.91±12.59	0.476
이완기혈압(mmHg)	79.25±8.97	78.80±9.30	79.03±9.08	0.826
맥박수(회/분)	74.45±10.70	76.18±9.37	75.31±10.03	0.445
신장(cm)	157.35±8.21	158.60±7.57	157.98±7.87	0.481
체중(kg)	60.55±9.61	62.11±8.81	61.33±9.20	0.454
체질량지수(kg/m^2)	24.49±3.76	24.70±3.10	24.59±3.43	0.793
K-MMSE	26.58±1.06	26.53±1.06	26.55±1.05	0.834

Values are presented as mean ± SD or number (percentage)

1) Analyzed by chi-square test

2) Analyzed by independent t-test

7.3 연구대상자 순응도

인체적용시험용제품의 섭취상황에 대하여 매 방문마다 연구대상자가 반납한 인체적용시험용제품의 잔여량을 반납 받고 순응도를 확인하였다. 평가방법은 아래와 같다.

$$\text{순응도(\%)} = \frac{\text{실제 섭취한 제품 수}}{\text{섭취하여야 할 제품 수}} \times 100$$

제품의 총 순응도(compliance)는 약 98% 이상이었으며, 순응도 미달은 없었다.

섭취군 간의 순응도는 고함유녹차카테킨추출물군과 위약군에서 차이가 없었다(P>0.05).

Table 3. 연구대상자의 순응도 (Compliance)

	녹차추출물군 (n=37)	위약군 (n=39)	전체 (n=76)	*P*-value[1)]
섭취해야 할 제품 수 (Prescriptions)	41.12±1.33	40.74±1.83	40.93±1.61	0.306
섭취한 제품 수 (Total intakes)	40.91±2.38	40.31±2.02	40.60±2.21	0.241
순응도(%)	98.08±3.88	98.05±2.99	98.07±3.43	0.838

Compliance was calculated by total intakes by prescriptions.

Values are presented as mean ± SD

[1)]Analyzed by independent t-test

7.4 연구대상자 생활습관 조사

7.4.1 식이섭취 변화

인체적용시험 참여기간 동안 연구대상자들이 섭취한 음식물 및 영양소 섭취 상태를 평가하기 위해1차방문(섭취 전), 3차방문(섭취12주후)에 식이섭취조사를 실시하였으며, 분석결과를 Table 4에 요약하였다.

섭취 전 · 섭취12주 후 식이섭취 변화를 비교한 결과, 모든 항목에서 섭취군 내 및 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

Table 4. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 식이섭취량 변화

	녹차추출물군 (n=37)				위약군 (n=39)				$p^{2)}$
	Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$	Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$	
열량(kcal)	1478.66±422.16	1418.82±481.42	-59.84±559.87	0.520	1404.75±385.48	1378.97±412.46	-25.78±521.80	0.759	0.784
탄수화물(g)	259.95±75.68	236.37±73.58	-23.58±98.43	0.154	240.65±55.97	240.14±71.73	-0.51±87.31	0.971	0.283
지방(g)	27.32±12.17	27.82±19.15	0.50±21.05	0.886	27.45±15.46	24.94±14.41	-2.51±18.79	0.410	0.513
단백질(g)	53.20±17.93	56.82±25.40	3.61±26.96	0.420	51.36±18.87	49.57±19.08	-1.79±24.70	0.654	0.365
식이섬유(g)	20.25±7.80	20.90±7.13	0.65±8.52	0.645	19.10±6.07	17.88±8.09	-1.22±9.36	0.422	0.367
비타민 A(ug RE)	801.73±413.45	703.12±414.47	-98.61±602.56	0.326	704.74±450.43	650.48±411.67	-54.26±592.36	0.571	0.747
베타카로틴(ug)	4244.62±2417.08	3756.47±2352.61	-488.15±3560.13	0.410	3806.55±2606.03	3280.94±2361.36	-525.60±3364.94	0.335	0.963
비타민 D(ug)	3.25±3.62	4.28±7.07	1.03±8.26	0.453	2.70±4.74	2.31±2.63	-0.40±5.58	0.657	0.378
비타민 E(mg)	11.66±6.18	11.28±5.96	-0.39±8.70	0.789	11.69±7.18	9.71±6.68	-1.98±9.26	0.191	0.443
비타민 K(ug)	236.89±180.55	251.17±198.06	14.29±259.72	0.740	178.81±144.85	145.23±115.44	-33.58±184.36	0.262	0.355
비타민C(mg)	115.92±59.43	98.78±49.22	-17.14±66.97	0.128	89.80±58.50	79.66±48.18	-10.14±76.03	0.410	0.672
티아민(mg)	0.97±0.46	1.00±0.40	0.03±0.55	0.722	0.93±0.37	0.91±0.35	-0.02±0.50	0.758	0.636
리보플라빈(mg)	0.94±0.35	0.83±0.37	-0.10±0.47	0.187	0.82±0.45	0.81±0.35	-0.01±0.48	0.895	0.393
니아신(mg)	12.21±5.54	11.97±5.73	-0.25±7.50	0.843	11.82±5.93	10.47±5.36	-1.35±6.78	0.221	0.503
비타민 B6(mg)	1.48±0.61	1.43±0.62	-0.05±0.69	0.652	1.31±0.55	1.23±0.45	-0.08±0.67	0.443	0.842
엽산(ug)	488.34±204.33	459.91±155.61	-28.42±242.49	0.480	398.24±155.90	386.79±116.19	-11.45±164.61	0.667	0.724
비타민 B12(ug)	6.02±4.76	6.09±5.35	0.07±6.55	0.946	8.37±9.92	5.30±6.01	-3.07±11.59	0.106	0.152
콜레스테롤(mg)	231.03±189.44	207.49±163.36	-23.54±203.84	0.487	169.59±143.68	213.48±210.02	43.89±271.14	0.318	0.226

Values are presented as mean ± SD

1) Analyzed by paired t-test between baseline and 12 week in each group

2) Analyzed by independent t-test for change value between groups

7.4.2 신체활동 변화

인체적용시험 참여 기간 동안 연구대상자들의 신체활동량을 평가하기 위해 1차 방문(섭취 전), 3차 방문(섭취 12주 후)에 신체활동 조사를 실시하였으며, 분석 결과를 Table5에 요약하였다.

신체활동도는 MET value가 높을수록 신체활동량이 많다는 것을 의미하며, 섭치 전 · 섭취 12주 후 신체활동도를 비교한 결과, 시험용제품 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 카테킨고함유녹차추출물군과 위약군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

Table 5. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 신체활동량 변화

	녹차추출물군 (n=37)				위약군 (n=39)				$p^{2)}$
	Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$	Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$	
MET value (min/week)	3408.86±3907.07	3228.65±3835.65	-180.22±4340.05	0.802	3064.10±3560.54	3340.51±3007.09	276.41±2602.84	0.511	0.577

Values are presented as mean ± SD

1) Analyzed by paired t-test between baseline and 12 week in each group

2) Analyzed by independent t-test for change value between groups

8. 유효성 평가

유효성 평가는 과학적 모델을 이용하여 분석하였을 때 이들 자료로써 충분히 치료효과를 나타낼 수 있도록 인체적용시험 계획서에 따라 인체적용시험을 완료한 연구대상자, 즉 계획서 순응 연구대상자군(Per Protocol Set) 76명을 주 분석대상으로 각 항목의 ±2 SD를 벗어나는 데이터를 이상치로 제외하고 분석하였다. 또한 추가적으로 ITT군을 분석하였다.

8.1 유효성 평가결과의 제시 및 분석

인체적용시험용제품 섭취 전에 측정한 인지기능검사 기저치 분석 결과를 Table 6에 요약하였다. 인지기능검사 점수 기저치를 비교한 결과, MoCA-K문장력 에서 카테킨고함유녹차 추출물 2.59±0.60점, 위약군 2.85±0.43점으로 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다 (P=0.040).

Table 6. 인지기능검사 기저치(baseline) 비교

	녹차추출물(n=37)	위약군(n=39)	전체 (n=76)	*P*-value[1)]
CNT_Visual_learning_test_A1	8.49±2.36	9.36±2.24	8.93±2.33	0.103
CNT_Visual_learning_test_A2	9.46±1.94	9.82±1.83	9.64±1.88	0.407
CNT_Visual_learning_test_A3	9.86±1.96	9.95±1.97	9.91±1.95	0.853
CNT_Visual_learning_test_A4	10.11±1.95	10.64±1.78	10.38±1.88	0.218
CNT_Visual_learning_test_A5	10.43±1.69	10.46±2.02	10.45±1.86	0.946
CNT_Visual_learning_test_Recognition	10.14±1.67	10.18±1.75	10.16±1.70	0.910
Visual_working_memory_test_정확도	27.12±14.49	32.74±17.23	30.00±16.10	0.129
Visual_working_memory_test_보정된정확도	17.97±16.29	20.81±19.03	19.43±17.69	0.488
Visual_working_memory_test_Reactiontime	631.57±111.96	611.81±78.00	621.43±95.91	0.373
CNT_VLT_A1	4.46±1.66	5.28±1.97	4.88±1.86	0.054
CNT_VLT_A2	7.14±2.02	7.64±2.02	7.39±2.02	0.278
CNT_VLT_A3	8.14±1.93	8.77±2.17	8.46±2.07	0.183
CNT_VLT_A4	9.19±2.07	9.77±2.13	9.49±2.11	0.233
CNT__VLT_A5	9.49±1.87	9.95±2.25	9.72±2.07	0.334
CNT_VLT_B	4.03±1.57	4.38±1.68	4.21±1.63	0.342
CNT_VLT_A7	7.92±2.25	7.64±3.32	7.78±2.84	0.669
CNT_VLT_A_delayed20min	7.27±2.43	7.46±2.99	7.37±2.72	0.761
CNT_VLT_지연재인	10.89±2.44	11.51±2.33	11.21±2.39	0.259
CNT_VLT_A1A5총합_학습시행	38.41±8.16	40.03±12.15	39.24±10.37	0.499
CNT_VLT_A1A5총합_평균	7.68±1.63	8.01±2.43	7.85±2.07	0.499
CNT_VLT_learningSlopeA5_A1_학습지표	5.03±1.66	4.67±2.13	4.84±1.91	0.412
CNT_VLT_A5_A20_기억유지도	2.22±2.10	2.49±2.45	2.36±2.27	0.607

MoCA_K_시공간_실행력	3.38±1.01	3.46±1.12	3.42±1.06	0.735
MoCA_K_어휘력	2.22±0.92	2.31±0.86	2.26±0.88	0.655
MoCA_K_주의력	5.08±1.01	4.90±0.97	4.99±0.99	0.421
MoCA_K_문장력	2.59±0.60	2.85±0.43	2.72±0.53	0.040
MoCA_K_추상력	1.78±0.48	1.79±0.47	1.79±0.47	0.919
MoCA_K_지연회상력	1.43±1.26	1.03±1.16	1.22±1.22	0.147
MoCA_K_지남력	5.68±0.47	5.64±0.49	5.66±0.48	0.754
MoCA_K_총점	22.35±2.94	22.18±2.99	22.26±2.95	0.801
Auditory continuous performance test_정반응수	122.43±23.39	124.31±14.71	123.39±19.32	0.675
Auditory continuous performance test_오반응수	7.84±6.52	7.79±7.52	7.82±7.00	0.979
Auditory continuous performance test_누락오류수	12.57±23.39	10.69±14.71	11.61±19.32	0.675
Auditory continuous performance test_Reaction time	0.75±0.14	0.76±0.05	0.75±0.10	0.676

Values are presented as mean ± SD or number (percentage)

[1] Analyzed by independent t-test

8.1.1 1 차 유효성 평가 결과: 인지기능검사(Cognitive function test)

1차 유효성 평가 지표인 인지기능검사를 1차 방문(섭취 전), 3차 방문(섭취 12주 후)에 실시하였으며, 분석 결과를 Table 7,8 에 요약하였다.

계획서 순응 연구대상자군(Per Protocol Set)에서 섭취 전 · 섭취 12주 후 인지기능검사 분석 결과, 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다.

Visual learning test A3 항목은 기저치 보정한 결과 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다.(P=0.012)

추가적으로 ITT군 분석한 결과 (Table 8), 섭취 전 · 섭취 12주 후 인지기능검사 Visual learning test A3 항목 위약군에서 섭취 전에 비해 섭취 12주 후가 유의하게 증가하였고 (P=0.002), 두 섭취군 간 비교 시에도 통계적으로 유의하게 차이가 있었다(P=0.042)

기저치를 보정한 결과 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다.(P=0.014)

그 외 다른 항목에서는 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

Table 7. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 1차 유효성 평가 변화(PP군)

	녹차추출물군 (n=37)				위약군 (n=39)					
	Baseline	12 week	Change value	$P^{1)}$	Baseline	12 week	Change value	$P^{1)}$	$P^{2)}$	$P^{3)}$
CNT_Visual learning test_A1	8.49±2.36	9.59±1.77	1.11±2.02	0.002	9.36±2.24	10.00±1.70	0.64±2.32	0.093	0.354	0.758
CNT_Visual learning test_A2	9.46±1.94	9.76±1.44	0.30±1.85	0.336	9.82±1.83	10.23±1.80	0.41±1.71	0.143	0.783	0.336
CNT_Visual learning test_A3	9.86±1.96	9.95±1.81	0.08±1.82	0.788	9.95±1.97	10.79±1.44	0.85±1.63	0.002	0.057	0.012
CNT_Visual learning test_A4	10.11±1.95	10.54±1.79	0.43±1.79	0.150	10.64±1.78	10.85±1.69	0.21±1.64	0.440	0.565	0.925
CNT_Visual learning test_A5	10.43±1.69	10.81±1.61	0.38±1.83	0.217	10.46±2.02	11.03±1.71	0.56±2.05	0.094	0.679	0.564
CNT_Visual learning test_Recognition	10.14±1.67	10.14±1.86	0.00±1.96	1.000	10.18±1.75	10.67±1.72	0.49±1.68	0.079	0.248	0.169
Visual working memory test_정확도	27.12±14.49	33.74±17.67	6.62±20.83	0.061	32.74±17.23	35.21±15.25	2.48±18.88	0.418	0.366	0.996
Visual working memory test_보정된 정확도	17.97±16.29	24.10±17.90	6.13±20.48	0.077	20.81±19.03	27.01±17.33	6.20±22.28	0.090	0.988	0.585
Visual working memory test_Reaction time	631.57±111.96	625.45±99.21	-6.12±109.16	0.735	611.81±78.00	616.33±92.49	4.53±122.43	0.819	0.691	0.858
Verbal Learning Test A1	4.46±1.66	5.95±2.19	1.49±1.97	0.000	5.28±1.97	6.18±2.19	0.90±1.67	0.002	0.162	0.389
Verbal Learning Test A2	7.14±2.02	7.95±2.17	0.81±1.91	0.014	7.64±2.02	8.18±2.30	0.54±1.55	0.037	0.497	0.711
Verbal Learning Test A3	8.14±1.93	9.03±2.24	0.89±1.85	0.006	8.77±2.17	9.56±2.20	0.79±1.73	0.007	0.814	0.816
Verbal Learning Test A4	9.19±2.07	9.49±2.42	0.30±2.34	0.445	9.77±2.13	10.08±2.19	0.31±1.91	0.320	0.983	0.586
Verbal Learning Test A5	9.49±1.87	10.24±2.68	0.76±2.13	0.037	9.95±2.25	10.49±2.16	0.54±2.17	0.130	0.660	0.906
Verbal Learning Test B	4.03±1.57	4.38±1.93	0.35±1.84	0.254	4.38±1.68	4.54±1.62	0.15±1.73	0.581	0.631	0.962
Verbal Learning Test A6	7.92±2.25	9.03±3.09	1.11±2.71	0.017	7.64±3.32	8.77±2.69	1.13±2.98	0.023	0.976	0.843
VLT A20(지연회상)	7.27±2.43	8.81±2.85	1.54±2.28	0.000	7.46±2.99	8.54±2.83	1.08±2.26	0.005	0.377	0.410
VLT REC(지연재인)	10.89±2.44	11.08±2.20	0.19±2.60	0.661	11.51±2.33	11.77±2.06	0.26±1.97	0.421	0.899	0.338
VLT_A1A5총합_학습시행	38.41±8.16	42.20±10.98	3.79±8.38	0.009	40.03±12.15	44.49±9.93	4.46±10.23	0.010	0.757	0.500
VLT_A1A5총합_평균	7.68±1.63	8.44±2.20	0.76±1.68	0.009	8.01±2.43	8.90±1.99	0.89±2.05	0.010	0.757	0.500
VLT_learningSlopeA5_A1_학습지표	5.03±1.66	4.30±2.12	-0.73±2.24	0.056	4.67±2.13	4.31±1.87	-0.36±2.42	0.361	0.492	0.792
VLT_A5_A20_기억유지도	2.22±2.10	1.43±1.77	-0.78±2.33	0.049	2.49±2.45	1.95±1.83	-0.54±2.59	0.203	0.667	0.259
Auditory continuous performance test_정반응수	122.43±23.39	129.24±8.30	6.811±22.25	0.071	124.31±14.71	129.31±8.41	5.000±9.92	0.003	0.645	0.850
Auditory continuous performance test_오반응수	7.84±6.52	6.30±7.63	-1.541±5.01	0.070	7.79±7.52	5.44±6.11	-2.359±5.58	0.012	0.504	0.461
Auditory continuous performance test_누락오류수	12.57±23.39	5.76±8.30	-6.811±22.25	0.071	10.69±14.71	5.69±8.41	-5.000±9.92	0.003	0.645	0.850
Auditory continuous performance test_Reaction time	0.75±0.14	0.75±0.06	0.006±0.13	0.787	0.76±0.05	0.75±0.05	-0.007±0.04	0.220	0.542	0.632

Values are presented as mean ± SD

1) Analyzed by paired t-test between baseline and 12 week in each group

2) Analyzed by independent t-test for change value between groups

3) Analyzed by ANCOVA (baseline as covariate)

Table 8. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 1차 유효성 평가변화 (ITT군)

	녹차추출물군 (n=38)				위약군 (n=40)					
	Baseline	12 week	Change value	$P^{1)}$	Baseline	12 week	Change value	$P^{1)}$	$P^{2)}$	$P^{3)}$
CNT_Visual learning test_A1	8.58±2.40	9.58±1.75	1.00±2.11	0.006	9.28±2.28	9.95±1.71	0.68±2.30	0.071	0.518	0.690
CNT_Visual learning test_A2	9.42±1.93	9.79±1.44	0.37±1.88	0.235	9.75±1.86	10.13±1.90	0.38±1.71	0.172	0.987	0.576
CNT_Visual learning test_A3	9.92±1.96	9.97±1.79	0.05±1.80	0.858	9.88±2.00	10.73±1.48	0.85±1.61	0.002	0.042	0.014
CNT_Visual learning test_A4	10.11±1.93	10.58±1.78	0.47±1.78	0.110	10.58±1.81	10.78±1.73	0.20±1.62	0.440	0.480	0.878
CNT_Visual learning test_A5	10.50±1.72	10.82±1.59	0.32±1.85	0.299	10.40±2.04	10.95±1.75	0.55±2.02	0.094	0.596	0.625
CNT_Visual learning test_Recognition	10.16±1.65	10.11±1.84	-0.05±1.96	0.869	10.13±1.76	10.58±1.80	0.45±1.68	0.098	0.227	0.189
Visual working memory test_정확도	27.28±14.33	34.08±17.56	6.80±20.57	0.049	32.50±17.08	35.17±15.06	2.67±18.68	0.372	0.355	0.939
Visual working memory test_보정된 정확도	18.07±16.08	24.17±17.67	6.10±20.20	0.071	20.25±19.12	27.04±17.11	6.79±22.31	0.062	0.886	0.548
Visual working memory test Reaction time	631.42±110.44	626.34±98.01	-5.09±107.86	0.773	612.47±77.11	613.40±93.16	0.93±122.96	0.962	0.819	0.707
Verbal Learning Test A1	4.45±1.64	5.87±2.21	1.42±1.98	0.000	5.30±1.95	6.13±2.19	0.83±1.71	0.004	0.158	0.396
Verbal Learning Test A2	7.08±2.02	7.87±2.20	0.79±1.89	0.014	7.65±1.99	8.15±2.28	0.50±1.55	0.048	0.461	0.697
Verbal Learning Test A3	8.08±1.94	8.87±2.42	0.79±1.93	0.016	8.80±2.15	9.53±2.18	0.73±1.77	0.013	0.878	0.740
Verbal Learning Test A4	9.11±2.10	9.34±2.55	0.24±2.34	0.537	9.80±2.11	10.05±2.17	0.25±1.92	0.415	0.978	0.541
Verbal Learning Test A5	9.42±1.88	10.08±2.83	0.66±2.18	0.071	9.95±2.22	10.50±2.14	0.55±2.15	0.113	0.827	0.900
Verbal Learning Test B	4.05±1.56	4.42±1.93	0.37±1.82	0.220	4.38±1.66	4.50±1.62	0.13±1.71	0.647	0.545	0.817
Verbal Learning Test A6	7.82±2.31	8.89±3.15	1.08±2.68	0.018	7.68±3.28	8.80±2.66	1.13±2.94	0.020	0.943	0.973
VLT A20(지연회상)	7.21±2.43	8.71±2.87	1.50±2.26	0.000	7.45±2.95	8.55±2.79	1.10±2.24	0.004	0.435	0.495
VLT REC(지연재인)	10.87±2.41	11.03±2.20	0.16±2.57	0.707	11.43±2.36	11.68±2.12	0.25±1.94	0.421	0.858	0.359
VLT_A1A5총합_학습시행	38.13±8.23	41.59±11.46	3.46±8.52	0.017	40.15±12.02	44.35±9.84	4.20±10.23	0.013	0.729	0.440
VLT_A1A5총합_평균	7.63±1.65	8.32±2.29	0.69±1.70	0.017	8.03±2.40	8.87±1.97	0.84±2.05	0.013	0.729	0.440
VLT_learningSlopeA5_A1_학습지표	4.97±1.67	4.21±2.16	-0.76±2.22	0.041	4.65±2.11	4.38±1.89	-0.28±2.45	0.482	0.360	0.552
VLT_A5_A20_기억유지도	2.21±2.07	1.37±1.79	-0.84±2.33	0.032	2.50±2.42	1.95±1.81	-0.55±2.56	0.182	0.601	0.195
Auditory continuous performance test_정반응수	122.76±23.16	129.24±8.19	6.474±22.04	0.078	124.35±14.52	129.43±8.34	5.075±9.81	0.002	0.716	0.934
Auditory continuous performance test_오반응수	7.71±6.48	6.32±7.53	-1.395±5.03	0.096	7.75±7.42	5.35±6.06	-2.400±5.52	0.009	0.404	0.369
Auditory continuous performance test_누락오류수	12.24±23.16	5.76±8.19	-6.474±22.04	0.078	10.65±14.52	5.58±8.34	-5.075±9.81	0.002	0.716	0.934
Auditory continuous performance test_Reaction time	0.75±0.14	0.76±0.06	0.005±0.12	0.793	0.76±0.05	0.75±0.05	-0.008±0.04	0.177	0.522	0.670

Values are presented as mean ± SD,

1) Analyzed by paired t-test between baseline and 12 week in each group

2) Analyzed by independent t-test for change value between groups

3) Analyzed by ANCOVA (baseline as covariate)

CNT (Computerized Neuro-Cognitive Funcgion Test)

본 인체적용시험에서 고함유카테킨녹차추출물군과 위약군을 섭취 12주 후를 위약군 기저치로 평균 (mean) 과 표준편차(standard deviation)를 이용하여 표준화 점수(z score)로 변환하여 각 영역별 z 점수 의 평균값을 domain composite score로 계산하여 최종적 으로 위약군의 측정 지표로 이용하였다.

카테킨고함유녹차추출물군과 위약군의 인지기능 Z score변화의 차이Table 6에서 CNT_Visual learning test_A3 항목에서 섭취 12주 후 녹차추출물군에 비해 위약군이 통계적으로 유의한 차이를 나타낸다(P=0.026).

그 외 다른 항목에서는 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(*P*>0.05).

시각,언어기억 검사는 working memory의 각 소항목별 (visual learning test A1, verbal learning test A1) 점수의 Z 점수의 평균값을 domain composite score로 계산하여 최종적으로 시각, 언어기억을 지표로 이용하였다.

시각,언어 20분지연 검사는 delaye memory의 각 소항목별 (visual learning test Recognition 과 verbal learning test REC(지연재인) 점수의 Z 점수의 평균값을 domain composite score로 계산하여 최종적으로 시각,언어 20분지연 지표로 이용하였다.

청각적 연속수행 검사는 Attention 의 Auditory continuous performance test 정반응수 점수의 Z 점수의 평균값을 domain composite score로 계산하여 최종적으로 청각적 연속수행 검사를 지표로 이용하였다.

전반적인 인지기능Global cognitive function 의 측정을 위해서 각 인지기능 영역(workingmemory, Attention, delaye memory)의 domain composite score의 평균값을 이용하였다.

Table 9. 녹차 추출군과 위약군 사이의 인지기능 Z score 변화의 차이

	녹차추출물군 (n:37)	위약군 (n:39)	*p*[1)]
	12 week	12 week	
CNT_Visual learning test_A1	0.10±0.79	0.29±0.76	0.312
CNT_Visual learning test_A2	-0.03±0.79	0.22±0.98	0.210
CNT_Visual learning test_A3	0.00±0.92	0.43±0.73	**0.026**
CNT_Visual learning test_A4	-0.06±1.00	0.12±0.95	0.447
CNT_Visual learning test_A5	0.17±0.80	0.28±0.85	0.575
CNT_Visual learning test_Recognition	-0.03±1.06	0.28±0.98	0.200
Visual working memory test_정확도	0.06±1.03	0.14±0.89	0.697
Visual working memory test_보정된 정확도	0.17±0.94	0.33±0.91	0.474
Visual working memory test_Reaction time	0.17±1.27	0.06±1.19	0.680
Verbal Learning Test A1	0.34±1.11	0.46±1.11	0.643
Verbal Learning Test A2	0.15±1.08	0.27±1.14	0.651
Verbal Learning Test A3	0.12±1.03	0.37±1.01	0.295
Verbal Learning Test A4	-0.13±1.14	0.14±1.03	0.268
Verbal Learning Test A5	0.13±1.19	0.24±0.96	0.663
Verbal Learning Test B	0.00±1.15	0.09±0.96	0.696
Verbal Learning Test A6	0.42±0.93	0.34±0.81	0.699
VLT A20(지연회상)	0.45±0.95	0.36±0.95	0.677
VLT REC(지연재인)	-0.18±0.95	0.11±0.88	0.163
VLT_A1A5총합_학습시행	0.18±0.90	0.37±0.82	0.343
VLT_A1A5총합_평균	0.18±0.90	0.37±0.82	0.343
VLT_learningSlopeA5_A1_학습지표	-0.17±1.00	-0.17±0.88	0.982
VLT_A5_A20_기억유지도	-0.43±0.72	-0.22±0.75	0.216
Auditory continuous performance test_오반응수	-0.20±1.01	-0.31±0.81	0.588
Auditory continuous performance test_누락오류수	-0.34±0.56	-0.34±0.57	0.973
Auditory continuous performance test_Reaction time	-0.10±1.21	-0.16±0.99	0.819
Attention	0.34±0.56	0.34±0.57	0.973
Working memory	0.22±0.96	0.37±0.95	0.336
Delayed memory	0.21±1.03	0.32±0.96	0.511
Global cognitive function	0.24±0.92	0.34±0.89	0.267

Values are presented as mean ± SD

[1)]Analyzed by independent t-test for after12weeks later between groups

Table 10. 인지기능의 녹차군 Z-score 결과 (PP군)

Z-score			
Visual learning test_A1	-3.69	Working memory	-2.82
Verbla learning Test_A1	-1.94		
Visual learning test_Recognition (20min)	-5.82	Delayed memory	-3.96
Visual learning test__A_delayed 20min	-2.09		
Auditory continuous performance test_정반응수	-8.04	Attention	-8.04

Table 11. 인지기능의 녹차군 Z-score 결과 (ITT군)

Z-score			
Visual learning test_A1	-3.69	Working memory	-2.85
Verbla learning Test_A1	-2.01		
Visual learning test_Recognition (20min)	-5.79	Delayed memory	-3.96
Visual learning test__A_delayed 20min	-2.13		
Auditory continuous performance test_정반응수	-8.36	Attention	-8.36

Table 12. 인지기능의 위약군 Z-score 결과 (PP군)

Z-score			
Visual learning test_A1	-0.07	Working memory	-0.01
Verbla learning Test_A1	0.06		
Visual learning test_Recognition (20min)	-0.06	Delayed memory	-0.03
Visual learning test__A_delayed 20min	0.00		
Auditory continuous performance test_정반응수	-0.18	Attention	-0.18

Table 13. 인지기능의 위약군 Z-score 결과 (ITT군)

Z-score			
Visual learning test_A1	0.04	Working memory	0.05
Verbla learning Test_A1	0.06		
Visual learning test_Recognition (20min)	-0.06	Delayed memory	-0.03
Visual learning test__A_delayed 20min	0.00		
Auditory continuous performance test_정반응수	-0.18	Attention	-0.18

8.1.2 2 차 유효성 평가 결과: 인지기능 평가척도(MoCA-K)

2차 유효성 평가 지표인 인지기능 평가척도(MoCA-K)를 1차 방문(섭취 전), 3차 방문(섭취 12주 후)에 측정하였으며, 분석 결과를 Table 14, 15 에 요약하였다.

계획서 순응 연구대상자군(Per Protocol Set)에서 인지기능 평가척도(MoCA-K)를 분석한 결과, 인지기능 평가척도 중 지남력에서 위약군이 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 유의하게 증가하였고(P=0.018), 두 섭취군 간 비교시 통계적으로 유의한 차이가 있었고(P=0.046), 기저치를 보정하여 비교하였을 때도 섭취군 간 유의적인 차이가 없었다(P=0.024).

추가적으로 ITT군 분석한 결과 (Table12 참고) , 인지기능 평가척도 중 지남력에서 위약군이 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 유의하게 증가하였고(P=0.018), 섭취군 간 비교 시에도 통계적으로 유의하게 차이가 있는 경향(P=0.046)이었으며, 기저치 보정 시에는 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다(P=0.024).

그 외 다른 항목에서는 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

Table 14. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 MoCA-K 변화(PP군)

	녹차추출물군 (n=37)				위약군 (n=39)					
	Baseline	12 week	Change value	$P^{1)}$	Baseline	12 week	Change value	$P^{1)}$	$P^{2)}$	$P^{3)}$
시공간/실행력	3.38±1.01	3.30±1.22	-0.08±1.12	0.661	3.46±1.12	3.62±1.27	0.15±1.11	0.393	0.361	0.276
어휘력	2.22±0.92	2.22±0.98	0.00±0.67	1.000	2.31±0.86	2.36±0.74	0.05±0.56	0.570	0.717	0.565
주의력	5.08±1.01	5.24±0.98	0.16±0.80	0.225	4.90±0.97	4.97±1.14	0.08±1.13	0.674	0.707	0.438
문장력	2.59±0.60	2.76±0.43	0.16±0.55	0.083	2.85±0.43	2.87±0.34	0.03±0.49	0.744	0.256	0.603
추상력	1.78±0.48	1.51±0.69	-0.27±0.77	0.039	1.79±0.47	1.72±0.56	-0.08±0.58	0.412	0.218	0.156
지연회상력	1.43±1.26	1.70±1.58	0.27±1.66	0.329	1.03±1.16	1.49±1.55	0.46±1.29	0.032	0.576	0.945
지남력	5.68±0.47	5.57±0.60	-0.11±0.74	0.378	5.64±0.49	5.82±0.39	0.18±0.45	0.018	0.046	0.024
총점	22.35±2.94	22.46±3.68	0.11±2.84	0.818	22.18±2.99	23.05±3.49	0.87±2.63	0.045	0.227	0.240

Values are presented as mean ± SD

1) Analyzed by paired t-test between baseline and 12 week in each group

2) Analyzed by independent t-test for change value between groups

3) Analyzed by ANCOVA (baseline as covariate)

Table 15. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 MoCA-K (ITT군 분석)

	녹차추출물군 (n=38)				위약군 (n=40)					
	Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$	Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$	$p^{2)}$	$p^{3)}$
시공간/실행력	3.37±1.00	3.29±1.21	-0.08±1.10	0.661	3.48±1.11	3.60±1.26	0.13±1.11	0.482	0.419	0.307
어휘력	2.24±0.91	2.24±0.97	0.00±0.66	1.000	2.33±0.86	2.35±0.74	0.03±0.58	0.785	0.859	0.706
주의력	5.08±1.00	5.24±0.97	0.16±0.79	0.225	4.90±0.96	4.98±1.12	0.08±1.12	0.674	0.708	0.438
문장력	2.58±0.60	2.76±0.43	0.18±0.56	0.051	2.83±0.45	2.88±0.33	0.05±0.50	0.534	0.270	0.560
추상력	1.79±0.47	1.53±0.69	-0.26±0.76	0.039	1.80±0.46	1.70±0.56	-0.10±0.59	0.291	0.292	0.222
지연회상력	1.45±1.25	1.71±1.56	0.26±1.64	0.329	1.00±1.15	1.45±1.55	0.45±1.28	0.032	0.575	0.988
지남력	5.68±0.47	5.58±0.60	-0.11±0.73	0.378	5.65±0.48	5.83±0.38	0.18±0.45	0.018	0.046	0.024
총점	22.37±2.90	22.50±3.64	0.13±2.80	0.774	22.18±2.95	22.98±3.48	0.80±2.63	0.062	0.281	0.301

Values are presented as mean ± SD

1) Analyzed by paired t-test between baseline and 12 week in each group

2) Analyzed by independent t-test for change value between groups

3) Analyzed by ANCOVA (baseline as covariate)

8.1.3 2 차 유효성 평가 결과: 혈중 BDNF, TAS / PSS(스트레스검사) ,BDI(우울증척도) 변화

2차 유효성 평가 지표인 혈중 BDNF, TAS 를 스크리닝 방문(섭취 전), 3차 방문(섭취 12주 후)에 측정하였으며, 분석 결과를 Table 16, 17에 요약하였다.

섭취 전 · 섭취 12주 후 혈중 BDNF, TAS 변화를 비교한 결과, 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

추가적으로 ITT군 분석한 결과에서도 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

2차 유효성 평가 지표인 PSS(스트레스검사), BDI(우울증 척도)를 스크리닝 방문(섭취 전), 3차 방문(섭취 12주 후)에 측정하였으며, 분석 결과를 Table 18, 19에 요약하였다.

섭취 전 · 섭취 12주 후 PSS(스트레스검사), BDI(우울증 척도) 변화를 비교한 결과, 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

추가적으로 ITT군 분석한 결과에서도 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05)

Table 16. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 위탁검사결과변화 (PP군)

	녹차추출물(N=37)				위약(N=39)				$p^{2)}$	$p^{3)}$
	Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$	Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$		
BDNF(pg/mL)	22910.679±5239.801	22100.110±4725.063	-810.569±4062.354	0.233	24012.186±6083.841	23411.091±6122.960	-601.095±2568.645	0.152	0.790	0.548
TAS(total antioxidant) (mmol/L)	0.94±0.14	0.98±0.14	0.04±0.11	0.038	0.95±0.14	0.97±0.15	0.02±0.10	0.281	0.384	0.403

Values are presented as mean ± SD

1) Analyzed by paired t-test between baseline and 12 week in each group

2) Analyzed by independent t-test for change value between groups

3) Analyzed by ANCOVA(baseline as covariate)

Table 17. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 위탁검사결과변화 (ITT군)

	녹차추출물군 (N=38)				위약군 (N=40)				$p^{2)}$	$p^{3)}$
	Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$	Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$		
BDNF(pg/mL)	22899.969±5168.930	21985.092±4714.394	-914.876±4058.343	0.173	24054.800±6011.381	23410.726±6043.951	-644.073±2550.029	0.118	0.727	0.479
TAS (total antioxidant) (mmol/L)	0.95±0.14	0.99±0.14	0.04±0.11	0.037	0.95±0.14	0.97±0.15	0.02±0.10	0.335	0.344	0.339

Values are presented as mean ± SD

1) Analyzed by paired t-test between baseline and 12 week in each group

2) Analyzed by independent t-test for change value between groups

3) Analyzed by ANCOVA(baseline as covariate)

Table 18. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 PSS(스트레스검사), BDI(우울증척도) 변화 (PP군)

	녹차추출물군 (n=37)				위약군 (n=39)				$p^{2)}$	$p^{3)}$
	Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$	Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$		
PSS총점	15.19±4.63	15.70±4.47	0.51±4.71	0.512	16.69±5.32	16.05±5.14	-0.64±4.44	0.373	0.275	0.611
BDI총점	9.65±5.14	10.27±7.27	0.62±5.97	0.530	12.21±8.75	10.74±9.22	-1.46±8.28	0.277	0.214	0.449

Values are presented as mean ± SD

1) Analyzed by paired t-test between baseline and 12 week in each group

2) Analyzed by independent t-test for change value between groups

3) Analyzed by ANCOVA(baseline as covariate)

Table 19. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 PSS(스트레스검사), BDI(우울증척도) 변화 (ITT군)

	녹차추출물군 (n=38)				위약군 (n=40)					
	Baseline	12 week	Change value	$P^{1)}$	Baseline	12 week	Change value	$P^{1)}$	$P^{2)}$	$P^{3)}$
PSS총점	15.29±4.61	15.76±4.43	0.47±4.65	0.534	16.70±5.25	16.05±5.08	-0.65±4.38	0.354	0.276	0.592
BDI총점	9.53±5.12	10.71±7.67	1.18±6.83	0.292	12.03±8.71	10.63±9.13	-1.40±8.18	0.286	0.135	0.309

Values are presented as mean ± SD

[1)] Analyzed by paired t-test between baseline and 12 week in each group

[2)] Analyzed by independent t-test for change value between groups

[3)] Analyzed by ANCOVA(baseline as covariate)

9. 안전성 평가

본 인체적용시험은 카테킨고함유녹차추출물과 위약을 섭취하였을 때, 체내 변화를 살펴보는 것을 목적으로 하였다. 안전성 평가는 시험에 참여하여 최소 1회 이상 인체적용시험제품을 섭취한 연구대상자80명을 대상으로 분석하였다.

9.1 이상반응

9.1.1 이상반응에 대한 요약

이상반응 발생률에 대한 결과를 Table 20에 요약하였다. 시험기간 전체 연구대상자 80명 중 5건의 이상반응이 발생하였다. 본 연구기간 동안 전체 연구대상자 80명 중 5건(녹차추출물군 2건, 위약군 3건)의 이상반응이 발생하였으며, 1명에서 1건의 경도 이상반응과 4명 4건의 중등도 이상반응이 발생하였다. 두 섭취군 간 이상반응의 발생에 유의한 차이가 없었으며(P>0.05), 발생한 이상반응 내용은 두근거림 1건, 왼쪽편측마비 1건, 기관지천식악화 1건, 이명 1건, 난청악화 1건이 있었으나, 두근거림 외에는 시험용제품 섭취와 인과관계는 없다고 판단하였다(P>0.05)

이상반응은 시험용제품 사용과 인과관계 가능성이 아주 약할 것으로 판단하였다.

Table 20. 이상반응 발생 빈도

	녹차추출물군 (n=40)	위약군 (n=40)	전체(n=80)	*p*-value[1)]
이상반응 발생 수(명)	2(5.0%)	3(7.5%)	5(6.3%)	1.000

Values are presented as number (percentage).

[1)] Analyzed by Chi-square test or Fisher's exact test.

9.3 진단검사의학 검사

혈액학 검사와 혈액생화학 검사, 소변 검사로 이루어진 진단검사의학 검사를 스크리닝 방문과 3차방문에 실시하였으며, 분석 결과를 Table21, 22에 요약하였다.

섭취 전· 섭취 12 주 후 진단검사의학 검사 결과의 변화를 정상과 비정상으로 (Table 21) 표기하였다. 녹차추출물군에서는 WBC, Creatinine, Specific gravity 을 제외한 나머지 항목에서 유의미한 차이가 있었으나, 위약군에서 WBC, Hb, Creatinine, Cholesterol, HDL Cholesterol, LDL-C, PH-UA, Nitrite_UA, Urobilinogen_UA, Bilirubin_UA, Occult_blood_UA 를 제외한 나머지 항목에서 유의미한 차이가 있음을 볼 수 있다.

Table 22에서와 같이, creatinine이 위약군 내에서 섭취 전보다 섭취 12주 후 유의하게 증가하였고(P=0.000), 두 섭취군 간 비교시 통계적으로 유의한 차이가 있었으나(P=0.002), 참고치 범위 내에서 일어난 임상적인 의미가 없는 변화라고 판단하였다.

진단검사의학 검사 항목 측정치에서 시험용제품 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 카테킨고함유녹차추출물군과 위약군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었으며(P>0.05), 임상적으로

의미 있는 변화도 없었다.

Table 21. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 진단검사의학 검사 결과 변화(정상/비정상)

	단위	정상범위	녹차추출물군					위약군				
			사전(n=39)		사후(n=37)		p-value[1]	사전(n=41)		사후(n=41)		p-value[1]
			정상	비정상	정상	비정상		정상	비정상	정상	비정상	
WBC	x10³/㎕	4.8~10.8	22	17	23	14	0.430	20	21	25	16	0.659
RBC	x100³/㎕	4.7~6.1	2	37	1	36	0.000	4	37	4	37	0.000
Hb	g/dl	13~18	22	17	18	19	1.000	27	14	23	18	0.188
Hct	%	42~52	7	32	5	32	0.000	9	32	6	35	0.000
Platelet	x10³/㎕	130 ~ 450	37	2	35	2	0.000	40	1	40	1	0.000
ALP	IU/L	45~129	39	0	36	1	0.000	38	3	37	4	0.000
gamma_GT	IU/L	12~73	31	8	33	4	0.000	31	10	32	9	0.001

	단위	정상범위	녹차추출물군					위약군				
			사전(n=39)		사후(n=37)		p-value[1)]	사전(n=41)		사후(n=41)		p-value[1)]
			정상	비정상	정상	비정상		정상	비정상	정상	비정상	
AST	IU/L	12~33	34	5	34	3	0.000	38	3	37	4	0.000
ALT	IU/L	5~35	38	1	37	0	0.000	38	3	39	2	0.000
Total bilirubin	mg/dl	0.2~1.2	35	4	33	4	0.000	40	1	39	2	0.000
Total Protein	g/dL	6.7~8.3	37	2	31	6	0.000	33	8	29	12	0.001
Albumin	g/dl	3.5~5.3	39	0	37	0	.	41	0	41	0	.
BUN	mg/dl	8~23	34	5	31	6	0.000	40	1	39	2	0.000
Creatinine	mg/dl	0.7~1.7	20	19	12	25	0.281	17	24	23	18	1.000
Cholesterol	mg/dl	~200	29	10	29	8	0.003	27	14	25	16	0.108
Triglyceride	mg/dl	~200	37	2	36	1	0.000	39	2	38	3	0.000
HDL Cholesterol	mg/dl	41.5~67.3	28	11	29	8	0.006	27	14	26	15	0.081
LDL-C	mg/dl	0~140	0	39	0	37	.	0	41	0	41	.
Glucose(serum)	mg/dl	74~106	35	4	31	6	0.000	37	4	33	8	0.000
CK	IU/L	46~171	33	6	29	8	0.000	37	4	34	7	0.000
LD (Lactate dehydrogenase)	IU/L	218~472	32	7	27	10	0.001	34	7	31	10	0.000
Specific gravity	-	1.005 ~1.030	39	0	37	0	.	39	2	40	1	0.000
pH_UA	-	4.5 ~9.0	38	1	37	0	0.000	41	0	41	0	.
WBC_UA	-	~Negative	32	7	26	11	0.001	30	11	30	11	0.004
Nitrite_UA	-	~Negative	38	1	37	0	0.000	41	0	41	0	.
Protein_UA	-	~Negative	38	1	37	0	0.000	37	4	38	3	0.000
Glucose_UA	-	~Negative	38	1	35	2	0.000	40	1	39	2	0.000
Ketone_body_UA	-	~Negative	36	3	35	2	0.000	38	3	38	3	0.000
Urobilinogen_UA	-	~trace	19	20	3	34	0.000	41	0	41	0	.
Bilirubin_UA	-	~Negative	38	1	37	0	0.000	41	0	41	0	.
Occult_blood_UA	-	~Negative	30	9	28	9	0.003	25	16	29	12	0.072
CRP	Mg/L	~5	38	1	32	5	0.000	39	2	39	2	0.000

Values are presented as number

[1)] Analyzed by McNemar test

Table 22. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 진단검사의학 검사 결과변화

	단위	정상범위	녹차추출물군 (n=38)				위약군 (n=40)				$p^{2)}$
			Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$	Baseline	12 week	Change value	$p^{1)}$	
WBC	x10³/μl	4.8-10.8	5.27±1.41	5.66±2.29	0.39±1.81	0.193	4.98±1.02	5.07±1.30	0.09±0.85	0.505	0.349
RBC	x10⁶⁴/μl	4.7-6.1	4.23±0.31	4.14±0.32	-0.09±0.16	0.001	4.32±0.31	4.24±0.34	-0.09±0.19	0.006	0.876
Hb	g/dl	13-18	13.17±1.06	12.86±1.25	-0.31±0.55	0.001	13.43±0.95	13.14±1.00	-0.29±0.56	0.002	0.888
Hct	%	42-52	39.26±2.81	38.27±3.11	-0.98±1.55	0.000	39.87±2.65	38.98±2.83	-0.90±1.68	0.002	0.809
Platelet	x10⁴/μl	130 - 456	229.26±70.42	224.08±71.97	-5.18±47.07	0.501	234.88±53.49	231.88±57.66	-3.00±22.48	0.404	0.796
ALP	IU/L	45-129	71.63±15.61	70.84±15.46	-0.79±11.35	0.671	65.03±15.36	66.75±19.51	1.73±10.48	0.304	0.312
gamma_GT	IU/L	11-73	23.21±18.02	22.47±13.50	-0.74±10.90	0.679	20.58±14.97	20.45±14.94	-0.13±9.00	0.930	0.787
AST	IU/L	12-73	25.71±5.84	25.50±6.25	-0.21±4.01	0.748	25.55±5.79	24.65±7.64	-0.90±6.12	0.358	0.560
ALT	IU/L	5-35	22.89±6.47	22.76±6.00	-0.13±7.03	0.909	22.58±7.56	66.75±19.51	-0.30±9.32	0.000	0.929
Total_bilirubin	mg/dl	0.2-1.2	0.84±0.34	0.82±0.32	-0.02±0.21	0.619	0.81±0.24	0.81±0.26	0.00±0.20	0.975	0.731
Total_Protein	g/dL	6.7-8.3	7.14±0.31	6.83±0.28	-0.31±0.28	0.000	6.98±0.37	6.79±0.34	-0.19±0.26	0.000	0.062
Albumin	g/dl	3.5-5.3	4.43±0.21	4.36±0.21	-0.08±0.14	0.001	4.38±0.16	4.34±0.18	-0.04±0.16	0.164	0.190
BUN	mg/dl	8-23	16.58±4.58	16.55±5.83	-0.03±4.74	0.973	15.80±4.11	16.18±4.04	0.38±4.45	0.597	0.701
Creatinine	mg/dl	0.7-1.7	0.69±0.14	0.68±0.13	-0.01±0.08	0.532	0.71±0.14	0.76±0.16	0.05±0.08	0.000	0.002
Cholesterol	mg/dl	<200	183.92±33.83	183.05±38.47	-0.87±21.32	0.803	186.58±36.10	194.35±38.22	7.78±26.65	0.073	0.119
Triglyceride	mg/dl	<200	101.53±42.82	101.63±39.02	0.11±42.29	0.988	115.98±49.55	116.23±50.40	0.25±42.92	0.971	0.988
HDL_Cholesterol	mg/dl	41.5-67.3	56.82±11.52	54.87±10.47	-1.95±7.34	0.110	53.93±15.33	53.18±15.81	-0.75±6.19	0.448	0.438
LDL_C	mg/dl	0-140	112.08±32.52	114.66±37.17	2.58±19.79	0.427	117.50±34.79	126.60±33.98	9.10±27.73	0.045	0.238
Glucose	mg/dl	74-106	96.42±15.11	98.11±22.45	1.68±11.59	0.376	95.33±23.39	97.93±29.41	2.60±17.84	0.362	0.790
CK	IU/L	46-171	101.63±43.34	117.42±75.93	15.79±67.58	0.158	106.10±41.28	116.38±59.66	10.28±48.76	0.190	0.679
LD	IU/L	218-472	422.24±70.20	431.32±63.51	9.08±49.67	0.267	415.95±63.88	429.45±82.25	13.50±46.68	0.075	0.686
Specific gravity	-	1.003 -1.030	1.02±0.00	1.02±0.00	0.00±0.01	0.171	1.02±0.01	1.02±0.01	0.00±0.00	0.514	0.138
pH_UA	-	4.5 -8.0	6.17±0.81	6.26±1.14	0.14±1.37	0.639	6.24±1.02	6.18±0.94	-0.06±1.23	0.750	0.483
CRP	Mg/L	<5	1.00±2.03	2.68±6.04	1.68±5.95	0.091	1.12±4.47	0.76±2.17	-0.36±4.36	0.603	0.088

9.4 활력징후

매 방문 마다 연구대상험자들의 활력징후(수축기혈압, 이완기혈압, 맥박수)를 측정하였으며, 분석 결과를 Table23 에 요약하였다.

카테킨고함유녹차추출물군과 위약군에서 수축기혈압과 이완기혈압, 맥박수는 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

임상적으로 의미가 있는 이상수치는 없었으며, 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

Table 23. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 활력징후 변화

	녹차추출물군(n=37)				위약군(n=39)					$P^{3)}$		
	Baseline	12 week	Change value	$P^{1)}$	Baseline	12 week	Change value	$P^{1)}$	$P^{2)}$	Time	Group	Time*group
수축기혈압 (mmHg)	125.54±12.33	133.08±9.82	7.54±11.86	0.000	126.00±13.87	128.00±14.22	2.00±14.31	0.388	0.071	0.000	0.493	0.117
이완기혈압 (mmHg)	73.41±10.23	77.22±8.73	3.81±9.46	0.019	75.79±9.08	78.64±9.01	2.85±8.96	0.055	0.649	0.004	0.155	0.641
맥박수(회/분)	75.22±9.95	74.89±9.45	-0.32±10.97	0.858	80.4 ±11.73	76.28±10.15	-4.13±8.17	0.003	0.090	0.092	0.088	0.174

Values are presented as mean ± SD

1) Analyzed by paired t-test between baseline and 12 week in each group

2) Analyzed by independent t-test for change value between groups

3) Analyzed by three way repeated measure ANOVA

9.5 기타 안전성 관련 항목

9.5.1 신체계측 지표 변화

신체계측 지표 검사를 스크리닝 방문(섭취 전), 3차 방문(섭취 12주 후)에 실시하였으며, 분석 결과를 Table24에 요약하였다.

신체계측 항목 측정치에서 시험용제품 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 카테킨고함유녹차추출물군과 위약군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었으며(P>0.05), 임상적으로 의미 있는 변화도 없었다.

Table 24. 인체적용시험용제품 섭취 전 · 섭취 12주 후 신체계측 지표(Body Mass Index, BMI) 변화

	녹차추출물군(n=37)				위약군(n=39)					$P^{3)}$		
	Baseline	12 week	Change value	$P^{1)}$	Baseline	12 week	Change value	$P^{1)}$	$P^{2)}$	Time	Group	Time*group
체중(Kg)	60.02±9.67	60.32±9.69	0.30±1.31	0.176	62.1615±8.92	61.7718±8.87	-0.39±1.90	0.209	0.072	0.807	0.400	0.072
BMI(kg/m²)	24.41±3.87	24.53±3.90	0.12±0.54	0.182	24.7128±3.14	24.5538±3.07	-0.16±0.76	0.198	0.069	0.807	0.841	0.069

Values are presented as mean ± SD

1) Analyzed by paired t-test between baseline and 12 week in each group

2) Analyzed by independent t-test for change value between groups

3) Analyzed by two way repeated measure ANOVA

10. 고찰 및 전반적인 결론

본 인체적용시험은 카테킨고함유녹차추출물 섭취가 인지기능 개선에 미치는 효과와 안전성을 평가하기 위한 12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 연구이다.

본 인체적용시험의 등록 목표 연구 대상자 수는 80명, 중도탈락률 30%를 고려한 종료목표 연구대상자 수는 56명으로서, 총 102명의 자원자가 서면동의서를 자발적으로 작성한 후 스크리닝 검사를 받았고, 연구대상자 적합성평가를 통해 총 76명이 적격 연구대상자로 선정되었다.

선정된 연구대상자는 이중눈가림 방법을 통해 카테킨고함유녹차추출물군과 위약군에 1:1 무작위배정 되어 본 인체적용시험에 참여하였다. 시험자는 모든 연구대상자를 대상으로 시험계획서에 정해진 바에 따라 신경인지기능검사, MoCA-K, 혈중 BDNF, TAS등 유효성 평가와 진단검사의학 검사를 비롯한 안전성 평가를 시행하였다. 유효성 평가를 위한 주분석군은 계획서 순응연구대상자군(Per Protocol Set)으로써, 중도탈락한 고함유녹차카테킨추출물군의 연구대상자 2명, 병용금지약물을 복용한 연구대상자 2명(고함유녹차카테킨추출물군 40명 중 3명, 위약군40명 중 1명)이 분석에서 제외됨에 따라, 총 76명의 연구대상자를 대상으로 유효성 평가 분석을 시행하였다. 안전성 평가를 위한 주분석군은 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 연구대상자군(Safety Set)이었다.

1차 유효성 평가 항목 분석 결과, 시각기억검사 중 Visual learning test A3 항목이 기저치 보정한 결과, 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다.(P=0.012)

추가적으로 ITT군 분석한 결과, 섭취 전 □ 섭취 12주 후 인지기능검사 Visual learning test A3 항목 위약군에서 섭취 전에 비해 섭취 12주 후가 유의하게 증가하였고(P=0.002) , 두 섭취군 간 비교 시에도 통계적으로 유의하게 차이가 있었다(P=0.042) 기저치를 보정한 결과 두 섭취군 간 통계적으로 유의하게 개선된 효과가 있었다.(P=0.014)

2차 유효성 평가 항목 분석 결과, 인지기능 평가척도 (MoCA-K, 혈중 BDNF, TAS / PSS (스트레스

검사) , BDI(우울증척도) 변화) 인지기능 평가척도 중 위약군에서 지남력에서 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 유의하게 증가하였고(P=0.018), 두 섭취군 간 비교시 통계적으로 유의한 차이가 있었고(P=0.046), 기저치를 보정하여 비교하였을 때도 섭취군 간 유의적인 차이가 없었다(P=0.024).

추가적으로 ITT군 분석한 결과, 인지기능 평가척도 중 지남력에서 위약군이 섭취 전에 비해 섭취 12주 후 유의하게 증가하였고(P=0.018), 섭취군 간 비교 시에도 통계적으로 유의하게 차이가 있는 경향 (P=0.046)이었으며, 기저치 보정 시에는 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 있었다(P=0.024).

2차 유효성 평가 항목 분석 결과, 섭취 전 · 섭취 12주 후 혈중 BDNF, TAS / PSS(스트레스검사), BDI(우울증 척도) 변화에서 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

추가적으로 ITT군 분석한 결과에서도 두 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없었다(P>0.05).

인체적용시험 참여 기간에 연구대상자들의 생활습관을 평가하기 위해 신체계측, 식이섭취와 신체활동 조사를 하였으며, 계획서순응연구대상자군(Per Protocol Set) 76명을 대상으로 분석 시, 카테킨 고함유녹차추출물군과 위약군의 열량, 거대영양소 및 식이섬유 섭취량, 신체활동량(MET value)에 있어서 섭취군 간 통계적으로 유의한 차이가 없어서, 연구대상자들이 인체적용시험에 참여하는 동안 일상생활을 일정하게 유지하였음을 알 수 있었고, 식이섭취와 신체활동도가 본 시험 결과에 미치는 영향이 없을 것으로 판단하였다.

안전성 평가를 위해 인체적용시험에 참여하여 최소 1회 이상 시험용제품을 섭취한 연구대상자 80명(Safety군)을 대상으로 이상반응, 진단검사의학 검사(혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 소변 검사), 활력징후 등의 측정 결과를 분석한 결과, 총 80명의 연구대상자 중 1명의 연구대상자에서 총 1건의 경도 이상반응이 발생하였다. 섭취군 간 이상반응 발생 수에 차이가 없었으며(P>0.05), 진단검사의학 검사와 활력징후 결과에서도 두 섭취군 간에 의미 있는 변화 또는 차이가 없었다(P>0.05).

요약하면, 본 인체적용시험을 통해 노령층 연구대상자에서 카테킨고함유녹차추출물 12주 섭취로 시각 기억 및 시지각 작업 기억과 같은 인지기능 개선 효과를 확인 할 수 없었다. 또한 본 연구가 진행되는 동안 임상적으로 의미 있는 이상반응이나 신체변화가 관찰되지 않아서 카테킨고함유녹차추출물 섭취의 인체 안전성이 확인되었다.

참고문헌

[1] 통계청. 한국의 사회지표. 통계청, 2003.

[2] 하은호, 박경숙(2011). 재가치매노인의 인지장애 영향 요인. 기본간호학회지, 18:317-327

[3] 보건복지부(2010). 치매임상진료지침-제 1 부: 진단 및 평가

[4] Kim, G. B. (1998). Prospect and situation of elderly dementia. The Korean Nurse, 37, 16-24.

[5] Hwang, Rahl· Lim, Ji Young· Lee, Young W hee. A Comparison of the Factors Influencing the Life Satisfaction of the Elderly According to their Cognitive Impairment Level. J Korean Acad Nurs Vol.39 No.5, 622-631.

[6] Matthews A et al. Interventions for nausea and vomiting in early pregnancy. The Cochrane Database Syst Rev (2014)

[7] Viljoen E et al. A systematic review and meta-analysis of the effect and safety of ginger in the treatment of pregnancy-associated nausea and vomiting. Nutrition Journal (2014)

[8] Kashefi F et al. Comparison of the effect of ginger and zinc sulfate on primary dysmenorrhea: a placebo-controlled randomized trial. Pain Manag Nurs (2014)

[9] Park YH, Won EK, Son DJ. 2002. Effect of pH on the stability of green tea catechins. J Fd Hyg Safety 17: 117-123.

[10] Nakabayashi T, Ina K, Sakata K. 1994. Chemistry and function of green, black and oolong tea. Kogagu Press, Kawasaki, Japan. P. 20-51.

[11] Ahmad N, Feyes DK, Nieminen AL, Agarwal R, Mukhtar H. 1997. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. J Natl Cancer Inst 89: 1881-1886.

[12] Feyes AL, Nieminen R, Ahmad ND. 1997. Green tea constituent epigallocatechin-3-gallate and induction of apoptosis and cell cycle arrest in human carcinoma cells. Journal of the National of the Cancer Institute 89: 1881-1886.

[13] Park SK, Kim TI, Lee WK, Park HK, Hong JT, Combination of Green Tea Extract and L-Theanine Alleviates Electric Foot Shock Induced Stress by Modulatir Neurotransmitters in Mice, J. Pharm. Soc. Korea, Vol. 53, No. 5, 2009

[14] Yuk DY, Kim TI, Park SG, Park HK, Yoon YK, Hong JT, Improvement of Memory Impairment by L-Theanine Through Inhibition of Acetylcholinesterase Activityin Mice, J. Pharm. Soc. Korea 2007, vol.51, no.6, pp. 409-414

[15] Kim TI, Yuk DY, Park SK, Park HK, Yoon YK, Hong JT, Improvement of Memory Impairment of Green Tea Extract/L-Theanine Through Inhibition of Secretas Activity and Cell Death In Vivo, J. Pharm. Soc. Korea 384~393 (2008) Vol. 52, No5

[16] Park SK, Jung IC, Lee WK, Lee YS, Park HK, Go HJ, Kim K, Lim NK, Hong JT, Ly SY, Rho SS. A combination of green tea extract and l-theanine improves memory and attention in subjects with mild cognitive impairment: a double-blind placebo-controlled study. J Med Food. 2011 Apr;14(4):334-43.

[17] Scholey A, Downey LA, Ciorciari J, Pipingas A, Nolidin K, Finn M, Wines M, Catchlove S, Terrens A, Barlow E, Gordon L, Stough C. Acute neurocognitive effects of epigallocatechin gallate (EGCG). Appetite. 2012 Apr;58(2):767-70.

[18] Ide K, Yamada H, Takuma N, Kawasaki Y, Harada S, Nakase J, Ukawa Y, Sagesaka YM. Effects of green tea consumption on cognitive dysfunction in an elderly population: a randomized placebo-controlled study. Nutr J. 2016 May 4;15(1):49.

[19] Okello EJ, Abadi AM, Abadi SA. Effects of green and black tea consumption on brain wave activities in healthy volunteers as measured by a simplified Electroencephalogram (EEG): A feasibility study. 11. Nutr Neurosci. 2016 Jun;19(5):196-205.

[20] Wightman EL, Haskell CF, Forster JS, Veasey RC, Kennedy DO. Epigallocatechin gallate, cerebral blood flow parameters, cognitive performance and mood in healthy humans: a double-blind, placebo-controlled, crossover investigation. Hum Psychopharmacol. 2012 Mar;27(2):177-86.

[21] Kazuki Ide, Hiroshi Yamada, Norikata Takuma, Mijong Park, Noriko Wakamiya, Junpei Nakase, Yuuichi Ukawa, Yuko M. Sagesaka, Green Tea Consumption Affects Cognitive Dysfunction in the Elderly: A Pilot Study, Nutrients 2014, 6, 4032-4042

[22] Stephanie R. Rainey-Smith, Belinda M. Brown, Hamid R. Sohrabi, Tejal Shah, Kathryn G. Goozee, Veer B. Gupta, Ralph N. Martins, Curcumin and cognition: a randomised, placebo-controlled, double-blind study of community-dwelling older adults, British Journal of Nutrition (2016) 115(12) 2106-2113

[23] Lee YH, Song JY, A Study of the Reliability and the Validity of the BDI, SDS, and MMPI-D Scales, Korean Journal of Clinical Psychology, 1991.5, 98-1

제11절 건기식 고시형원료서의 EGCG 고함유 녹차소재

1. 식품의약안전처 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), 초에틸로 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

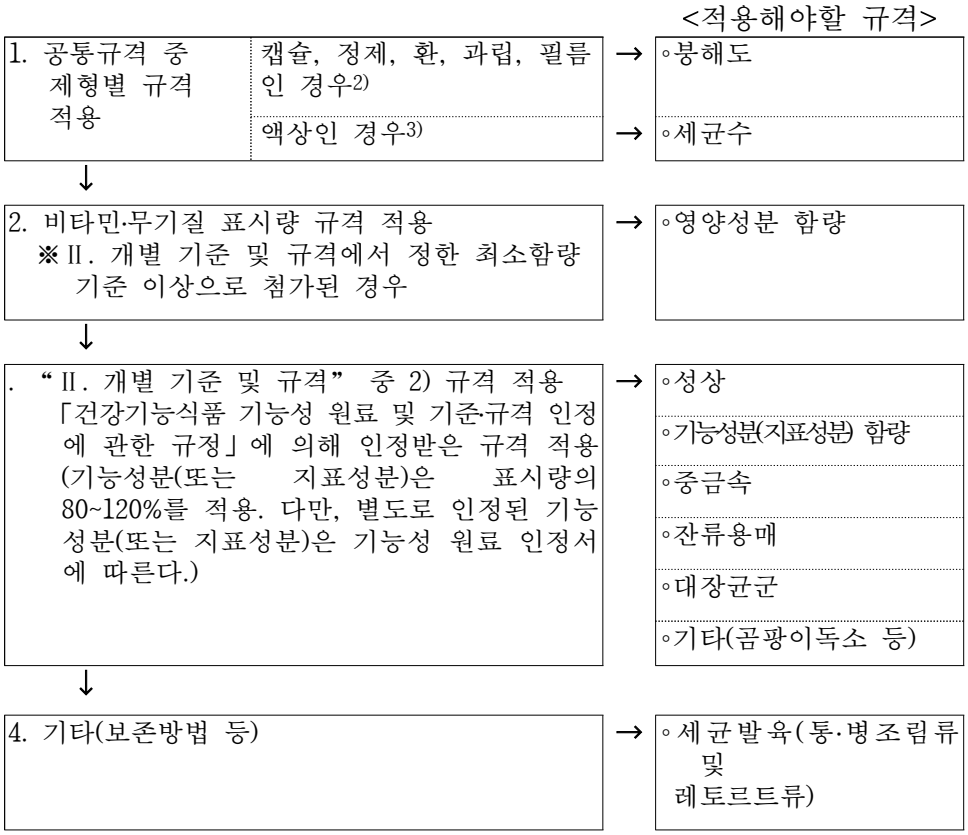
(1) 카테킨 : 제 4. 3-47 카테킨

(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.

국민신문고

이 메일은 류 ○○회원님에게 발송된 메일입니다.
(2018년 10월 18일)

국민신문고 바로가기

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 부탁 드립니다
민원내용	

사업자등록번호 483-86-00246

(*첨부한 파일을 참조하시면 더욱 편리하게 검토하실 수 있습니다.)

1. 업체명
㈜알앤오식품

2. 원료명
녹차추출물

3. 질의 내용
녹차추출물을 이용하여 건강기능식품 개발 진행 중인 ㈜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) 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

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℃, 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%
↓ 크로마토그라피(수용성 주정) 후
분획물별 감압농축
건조 EGCG고함유분획물의 940~980 mg/g 5.1%
동결건조(백색분말)

2) 지표성분의 함량
구성성분 EGC Caffenine 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) 성상 : 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) 충진제, DSM사 고농축녹차추출물의 제조공정과 동일]하여 농축, 마지막으로 분말화 공정을 통해 제조하게 됩니다. 최종 원료의 기능성성분 카테킨의 함량은 200mg/g 이상이고 EGCG로서 950~980 mg/g 함유되어 있으며, 4개 카테킨이 모두 확인됩니다. 또한 카페인은 없으며, 잔류용매 초산에틸(EA)는 허용기준치 이하입니다.

3~4년 전부터 본 녹차추출물의 개별인정형 원료를 목표로 개발을 진행해 왔으나 인허가 신청 제출에 앞서 본 소재가 고시형 건강기능식품 기준에 적합한지, 아니면 개별인정형이어야 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

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 명시도록 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 .

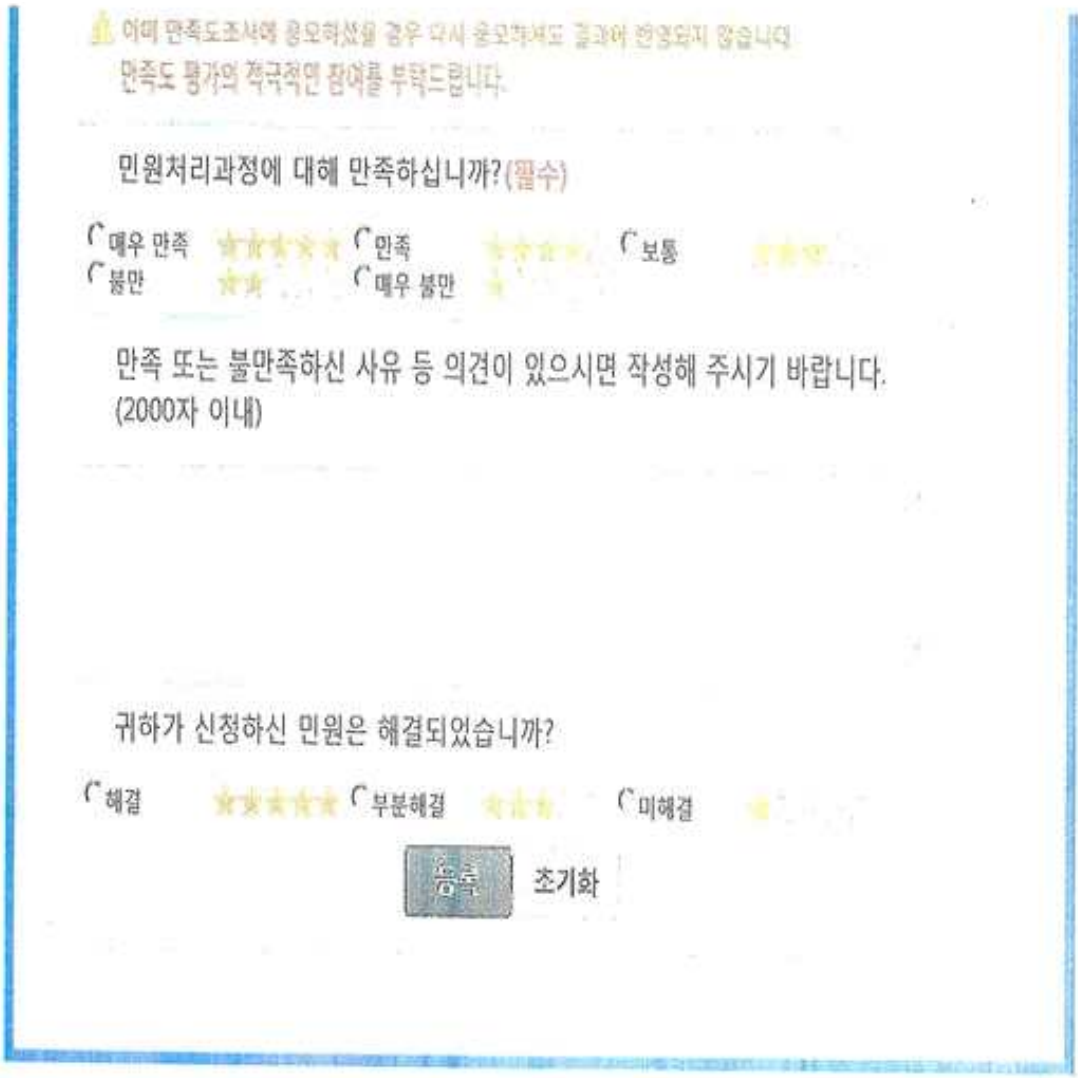
라 . 참고로 , 우리처 홈페이지 (http://www.mfds.go.kr) 및 식품안전나라 (http://www.foodsafetykorea.go.kr) 를 이용하시면 식품 관련 규정 및 정보를 보다 편리하게 이용하실 수 있습니다 .

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

민원처리과정 만족도조사 - 식품의약품안전처 -



이메일 주소를 변경하시려면, 나의 이용내역 > 정보관리에서 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(2017.06.15.-2017.12.31.)

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도	기여도
주/부원료 배율에 따른 제형및제제 설정 및 항노화 시작품 제작	-점진적 소재 양산화 -최적 안정적 조성물 검토 및 최적 제형제제화 확립	-생산 표준화를 위한 용매분배, 분리정제, 재결정공정의 최적화 조건 설정 -안정성있는 제제 설계 위해 원료물질의 물리화학적 성상 및 특이성 파악 -약물용해도 분배계수, 용출속도, 물리적 형태 및 안정성 파악	100%	
고순조 EGCG에 대한 항산화 및 항당뇨 효능평가	-총페놀 함량 측정 -총플라보노이드 함량 측정 -in vitro DPPH 소거능 측정 -in vitro ABTS radical 소거능 측정	-DPPH소거능 측정 -ABTS radical 소거능 측정 -ROS 생성량 측정 -FRAP	100%	
	-산화 스트레스에 의한 혈액 내 혈구수 변화량 측정 -산화 스트레스에 의한 혈액 내 항산화 지표변화량 측정 -간조직내 항산화 관련 인자 변화량 측정	-APPH 7일 투여를 통한 산화스트레스 유도 모델 구축 -Coulter conter를 통한 WBC, RBC, pletlet, Hb 측정 -Albumin, biluibin, uric acid, LDL, 측정 -간조직으로부터 MDA, NO생성량 측정 및 SO와 catalase 활성 측정	100%	
	-체중, 식이섭취량 측정 -4주간 공복혈당 추적 측정 -경구당부하(OGTT) 측정	-자발적 당뇨 유발 유전 동물 모델인 db/db mouse model 활용 -당뇨가 유발되도록 4주간 고지방식이 1주1회, 지정된 시간에 혈당 측정 -OGTT 측정 위해 포도당을 경구투여 후 시간별 혈액 내 당농도 측정	100%	

제2절 2차년도(2018.01.01.-2018.12.31.)

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도	기여도
제품 완성도 제고 위해 제품디자인 개발하여 항노화 시제품 제작	고순도 EGCG소재 생산	인지기능개선 인체적용시험 시험약 제작을 위한 고순도 EGCG 소재 생산(5kg)	100%	
	네이밍및브랜드개발	Name명: 알오고(Alogo) 브랜드명:알오고Premium 알오고Gold	100%	
	제품 디자인 설계 및 단상자 제작	-스틱제품(분말/과립) -Bottle(분말/과립-캡슐) -Plate(분말/과립-캡슐) 상기 3종에 대한 라벨지, 페키지 디자인, 단상자 설계 및 제작	100%	
설정된 제형 및제제 복합소재에 대한 안정성평가 및 품질검사	온도, 습도, 광도에 안정한 유효기간 설정	다양한 보관조건에서 분말 및 수용액상에 대한 EGCG 함량변화를 측정하여 안정성을 검토하여 유효기간을 설정함	100%	
	농약, 잔류용매, 미생물, 중금속	-잔류농약검사 -잔류용매(EA)분석시험 -미생물(대장균)검사 -중금속검사	100%	
세포실험 및 동물실험을 통한 인지기능개선 전임상 효능평가 및 작용기전 연구	고순도 EGCG뇌신경세포의 염증발 개선에 미치는 효능 연구	-순도 EGCG의 산화적 스트레스 유도 동물모델 (in vivo)에서 항노화 효능평가 -당뇨동물모델인 db/db mouse 에서 고순도 EGCG의 항당뇨 효능 평가	100%	
	고순도 EGCG가 뇌신경세포의 염증발생 동물모델에서 인지기능 개선에 대한 효능 연구	-고순도 EGCG의 인지능력장애 개선 효능에 대한 in vitro (세포배양) 평가 -고순도 EGCG의 인지능력장애 개선 효능에 대한 in vivo (실험동물) 평가	100%	

제3절 3차년도(2019.01.01.-2019.12.31.)

세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	달성도	기여도
소재의양산화 및 시제품생산, 인지기능개선 임상시험을 통한 유효성 및 안정성 평가	EGCG 소재의 점진적 양산화	대량 생산화 과정에서 탈카페인화가 원만하게 이루어지지 않아 최종적으로 양이온교환수지를 활용한 대체 방법을 제시하였음	100%	
	평가회및홍보	생산공정등에 대한 전문가 의견(평가회)을 들었으며 잡지, 신문 등에 제품/회사를 홍보하였음	90%	
	완제품 시제품 제작	원료제품, 캡슐제품, 스틱제품을 제작함	100%	
	식약처 항노화 개별인정형 원료 인허가 신청및획득	소재는 고시형원료로 인정되었으나 인지기능개선 임상시험에서 유의적 결과를 나타나지 않아 기능성추가가 지연됨	80%	
	인지기능개선 인체적용시험	12주, 무작위배정, 이중눈가림, 위약대조 인지기능개선 임상시험을 80명 피험자를 대상으로 실시, 완료함	100%	
	CRO 모니터링	상기 임상시험을 모니터링함	100%	
안정성평가 및품질검사	소재 안정성 평가	분말 및 수용성 소재에 대한 안정성을 다양한 조건에서 실시하여 유효기간을 설정함	100%	
	이화학적 특성 및 품질검사	한국기능성시험센타에 의뢰, 제조규격에 대한 시험성적서를 확보함	100%	

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연구개발 성과

1. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부	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	Epigallocatechin gallate 고함유 녹차 추출물의 제조공정 개선	한국생약학회지	류건식	50(3) 198-204	한국		비SCI	2019.09.27	
4	Herbal medicine(Hepad) prevents dopaminergic neuonal death in the rat MPTA model of parkinnson's disease	Intergrative Medicine Research	최정준	8(2019) 202-208	미국		SCIE	2019.11.29	

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 nutraceutic	2017.10.22.~ 2017.10.25	새만금컨벤션센타	영어
2	차학회	녹차 유래 고순도 EGCG소재의 대량생산 및 안전성연구	2017.10.22	경남 하동	한국어
3	차학회	건강기능식품 소재 EGCG고함유녹차 추출물의 안정성(stability)연구	2018.06.09	서울 코엑스	한국어
4	차학회	건강기능식품 소재 EGCG고함유녹차 추출물의표준화 및 규격화	2018.06.09	서울 코엑스	한국어
5	한국식품영양과학회	EGCG고함유녹차추출무의 피부주름 개선 및 보습증진에 관한 연구	2018.10.31	부산 벡스코	한국어
6	한국식품영양과학회	EGCG고함유녹차추출물의 체지방 조절 기능에 대한 연구	2018.10.31	부산 벡스코	한국어
7	한국식품영양과학회	보관조건에 따른 건강기능식품 신규소재 EGCG고함유녹차추출물의 안정성 연구	2018.10.31	부산 벡스코	한국어
8	한국식품영양과학회	건강기능식품 신규소재 EGCG고함유 녹차추출물의 규격화 및 표준화 연구	2018.10.31	부산 백스코	한국어
9	차학회	탈카페인,카테키노함유녹차추출물의 체지방감소~	2019.06.14	서울 코엑스	한국어
10	차학회	탈카페인,카테키노함유녹차추출물의 인지능력개선~	2019.06.14	서울 코엑스	한국어
11	차학회	탈카페인,카테키노함유녹차추출물의 피부주름개선~	2019.06.14	서울 코엑스	한국어
12	차학회	탈카페인,카테키노함유녹차추출물의 항당뇨~	2019.06.14	서울 코엑스	한국어

3. 전시 및 홍보

No	행사명/신문잡지명	발표내용	목적	일시
1	국제건강기능학회/새만금컨벤션센타	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	바이오식품산업의 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			등 록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	탈카페인 및 초고순도 에피갈로카테킨 갈레이트의 양산방법	대한민국	㈜알앤오식품	2019.09.16	10-2019-0113722				100%
2	에피갈로카테킨 갈레이트를 유효성분으로 함유하는 피부주름개선용 조성물	대한민국	㈜알앤오식품	2019.10.01	10-2019-0121437				100%
3	에피갈로카테킨갈레이트를 유효성분으로 포함하는 인지능력개선용 조성물	대한민국	대전대학교	2019.9.12	10-2019-0107930				100%

5. 저작권(소프트웨어, 서적 등)

No	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록번호	저작권자명	기여율

6. 전문연구 인력양성

No 1	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	교육 개최회수	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	탈카페인 및 초고순도 에피갈로카테킨갈레이트의 양산방법	㈜알앤오식품	2019.9.16	12,600천원 ( )	

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 인지기능개선의 복합 기능을 갖는 제품화를 목표로 하였다. 과제 수행 기간 중에 본 소재가 고시형 녹차추출물로 인정됨에 따라 완제품의 조기 런칭이 가능해 졌지만 인지기능개선 인체적용시험에서 유의적 평가가 도출되지 못하여 2차 분석이 진행 중이며 섭취량을 높인 추가 임상시험을 계획중이다. 그 결과에 따라 개별인정에서 <기능성추가> 인정을 받아 인지기능개선 건기식 제품을 상용화하는 데 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 Gallocatechin Gallate and Catechin Gallate rre 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, Q1, 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 materal 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-a 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 bylong-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)

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.