

발 간 등 록 번 호

안내서-0776-02

국민 **안심**이 기준입니다

# 건강기능식품 기능성 평가 가이드 (민원인 안내서)

-피로개선 관련-

2022. 7.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

## 지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

|                                                                                                                  |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                 |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 명칭                                                                                                               | 건강기능식품 기능성 평가 가이드<br>(피로개선 관련)                                                                                                                                          |                                                                                                                 |
| 아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.                                                                                      |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                 |
| 등록대상<br>여부                                                                                                       | <input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의<br>지침서 · 안내서가 있습니까?                                                                                            | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오                                           |
|                                                                                                                  | <input checked="" type="checkbox"/> 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로<br>고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한<br>경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다.<br>(사유 : ) |                                                                                                                 |
|                                                                                                                  | <input type="checkbox"/> 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의<br>내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?                                                                            | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오                                           |
|                                                                                                                  | <input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?                                                                                                                   | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오                                           |
|                                                                                                                  | <input type="checkbox"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시 · 명령에 해당하는<br>내용입니까?                                                                                                    | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오                                           |
|                                                                                                                  | <input type="checkbox"/> 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?                                                                                                                       | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오                                           |
|                                                                                                                  | <input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한<br>자료입니까?                                                                                                   | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오                                           |
|                                                                                                                  | <input checked="" type="checkbox"/> 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이<br>아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.                                         |                                                                                                                 |
| 지침서 · 안내서<br>구분                                                                                                  | <input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로<br>행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까?<br>(공무원용)                                                                         | <input type="checkbox"/> 예( <input checked="" type="checkbox"/> 지침서)<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오 |
|                                                                                                                  | <input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시 · 훈령 · 예규 등을 알기 쉽게<br>풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의<br>입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)                                                 | <input checked="" type="checkbox"/> 예( <input checked="" type="checkbox"/> 지침서)<br><input type="checkbox"/> 아니오 |
| 기타 확인<br>사항                                                                                                      | <input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나<br>민원인을 구속하는 내용이 있습니까?                                                                                          | <input type="checkbox"/> 예<br><input checked="" type="checkbox"/> 아니오                                           |
|                                                                                                                  | <input checked="" type="checkbox"/> 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 ·<br>안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.                                                           |                                                                                                                 |
| 상기 사항에 대하여 확인하였음.                                                                                                |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                 |
| 2022년 7 월 일                                                                                                      |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                 |
| <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div>담당자<br/>확 인(부서장)</div> <div>이 해 영</div> </div> |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                 |

이 안내서는 건강기능식품 기능성 원료 평가에 대하여 이해를 돕고자, 현재의 과학기술 수준에서 일반적인 사항과 시험방법 등이 제시된 참고자료이며, 질병에 관련된 내용이 포함되는 경우 기능성에 대한 전반적인 이해를 돕기 위한 것이지, 질병의 치료 및 예방을 목적으로 기능성을 설명하는 것은 아닙니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식 (‘~하여야 한다’ 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2022년 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ “민원인 안내서”란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품 안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 식품위해 평가부 영양기능연구과으로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4402, 4409, 4416, 4417, 4419, 4422, 4428, 4429

팩스번호: 043-719-4420

## 제·개정 이력

| 연번 | 제·개정번호      | 승인일자     | 주요내용                                                                      |
|----|-------------|----------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1  |             | 2014.12. | 제정                                                                        |
| 2  | 안내서-0776-01 | 2017.6.  | 「식약처 지침서 등의 관리에 관한 규정」에<br>따른 등록 번호 일괄 정비<br>(규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16.) |
| 3  | 안내서-0776-02 | 2022.7.  | 개정<br>(시험 설계 시 고려사항 등 업데이트)                                               |



|                       |   |
|-----------------------|---|
| ※ 건강기능식품의 기능성 개요..... | 1 |
|-----------------------|---|

|           |   |
|-----------|---|
| ※ 약어..... | 3 |
|-----------|---|

|             |   |
|-------------|---|
| <b>I</b> 서론 | 4 |
|-------------|---|

|                  |   |
|------------------|---|
| <b>II</b> 일반적 사항 | 4 |
|------------------|---|

|                           |   |
|---------------------------|---|
| 1. 피로의 정의.....            | 4 |
| 2. 피로의 발생원인 및 신체적 변화..... | 4 |

|                      |    |
|----------------------|----|
| <b>III</b> 기능성 시험 방법 | 13 |
|----------------------|----|

|                         |    |
|-------------------------|----|
| 1. 바이오마커의 선정.....       | 13 |
| 2. 주요 바이오마커의 측정 방법..... | 21 |
| 3. 시험 설계 시 고려사항.....    | 29 |

|                |    |
|----------------|----|
| <b>IV</b> 참고문헌 | 35 |
|----------------|----|



## 건강기능식품의 기능성 개요

### □ 기능성 정의

건강기능식품법 제3조(정의) : 기능성이란 인체의 구조와 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다.

### □ 기능성 구분

건강기능식품의 기능성은 3가지로 구분할 수 있다.

#### ○ 건강기능식품의 기능성 구분

| 기능성 구분       | 기능성 내용                                                            | 기능성을 가진 원료 또는 성분 |
|--------------|-------------------------------------------------------------------|------------------|
| 영양소 기능       | 인체의 정상적인 기능이나 생물학적 활동에 대한 영양소의 생리학적 작용                            | 영양소              |
| 생리활성 기능      | 인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능 향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 기능 | 기능성 원료           |
| 질병발생 위험감소 기능 | 질병의 발생 또는 건강상태의 위험감소와 관련한 기능                                      |                  |

## □ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준은 다음과 같다.

### ○ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

| 구분                                | 기능성 내용              | 인정기준                                                                                                                                                                                            |
|-----------------------------------|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 질병발생<br>위험 감소<br>기능 <sup>1)</sup> | ○○발생위험 감소에<br>도움을 줌 | 기반연구 자료를 통해 생리학적인 효과 또는 기전이<br>명확하게 입증되어야 하고 일관성 있는 바이오마커의<br>개선효과가 다수의 인체적용시험(RCT)에서 확보<br>되어야 함<br>※ 질병 관련 바이오마커의 확인                                                                          |
| 생리활성<br>기능 <sup>2)</sup>          | ○○에 도움을 줄 수 있음      | 기반연구 자료를 통해 가능성 있는 생리학적인 효과 또는<br>기전을 추측할 수 있어야 하고 일관성 있는 바이오마커의<br>개선효과가 최소 1건 이상의 인체적용시험(RCT)에서<br>확보되어야 함(추측 제안기전과 관련한 바이오마커가<br>기반연구시험과 인체적용시험에서 일관성 있게 확인<br>되어야 함)<br>※ 생리활성 관련 바이오마커의 확인 |

- 1) 제출된 기능성 자료가 질병의 발생 위험 감소를 나타내며, 확보된 과학적 근거 자료의 수준이 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)에 이를 수 있을 정도로 높을 경우 인정. 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)란 성분 또는 원료와 건강효과 간의 상관성이 새로운 과학에 의해 뒤집어지지 않을 정도의 수준으로 관련 분야의 전문가들에 의한 만장일치에 가까운 합의 수준을 말함
- 2) 제출된 기능성 자료가 인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 경우 인정

## 약 어

|                   |                                           |
|-------------------|-------------------------------------------|
| 5-HT              | 5-hydroxytryptamine                       |
| ACTH              | Adrenocorticotrophic hormone              |
| CFS               | Chronic fatigue syndrome                  |
| CK                | Creatine kinase                           |
| CORT              | Corticosterone                            |
| CPTII             | Conner's continuous performance test II   |
| CS                | Citrate synthase                          |
| EMG <sub>FT</sub> | Electromyographic fatigue threshold       |
| FAD               | Flavin adenine dinucleotide               |
| FFA               | Free fatty acid                           |
| GPx               | Glutathione peroxidase                    |
| HK                | Hexokinase                                |
| IL                | Interleukin                               |
| IRMA              | Immunora diometric assay                  |
| LDH               | Lactate dehydrogenase                     |
| MADRS             | Montgomery-Asberg depression rating scale |
| MAO               | Monoamine oxidase                         |
| MDA               | Malondialdehyde                           |
| MDH               | Malate dehydrogenase                      |
| MVC               | Maximal voluntary contraction             |
| PBS               | Pine's burnout scale                      |
| PSQI              | The Pittsburg Sleep Quality Index         |
| QOL               | Quality of life                           |
| SDH               | Succinate dehydrogenase                   |
| SOD               | Superoxide dismutase                      |

## I 서론

이 가이드는 건강기능식품 기능성원료를 개발하는 연구자 및 영업자에게 식품의약품 안전처의 기능성(피로개선에 도움) 평가 원칙 및 기준 등을 알림으로써 산업체의 기능성원료 연구개발에 적정을 기하고 효율성을 높이고자 작성되었다.

## II 일반적 사항

### 1. 피로의 정의

육체적, 정신적 능력이 감소되는 현상으로, 병리적 피로, 생리적인 피로, 심리적 피로로 분류할 수 있다. 병리적 피로란 피로 감각이 생겨 간 기능 저하, 당뇨병, 위장병 등 질병까지 발생하는 것을 이르며, 혈액 속에 피로물질이 축적되어 피로감을 느끼는 것을 생리적 피로라 한다. 심리적 피로는 감정적인 갈등, 불안 또는 권태감에서 생기는 피로를 말하며 지속적인 활동이나 자극 후 세포, 근육, 기관의 힘이나 민감도가 일시적으로 감퇴된 상태를 말한다.

대부분 충분한 휴식을 취하면 피곤함이 떨어지는데 휴식을 취해도 1개월 이상 피로가 계속된다면 지속성 피로, 6개월 이상 지속될 시 만성피로라 불린다.

### 2. 피로의 발생원인 및 신체적 변화

#### (1) 피로

① 근육 내 포스포크레아티닌 부족, ② 근육 내 프로톤 축적(산성혈증), ③ 근육 내 글루카곤 부족, ④ 혈액 내 글루코스 농도 감소, ⑤ 혈장 내 특정 아미노산 비율의 증가 등으로 인하여 피로가 발생되어, 말초, 중추 피로에 영향을 주게 된다. 중추신경 피로의 경우 골격근의 활동이 줄어드는 것을 의미하며, 말초피로는 신경근 접합부를 변화시킨다.

## (2) 만성피로증후군

만성피로 증후군(Chronic fatigue syndrome, CFS)은 특별한 원인 질환 없이 임상적으로 설명되지 않는 피로가 6개월 이상 지속적 또는 반복적으로 나타나 일상생활에 심각한 영향을 미치는 상태를 의미한다. 피로는 사람들에게 가장 흔한 증상이지만, 만성피로증후군은 단순한 만성피로와는 구별되는 병태를 보인다. 주 증상으로 인지능력감소, 수면 장애, 통증, 집중력 저하 등이 나타나며, 이와 관련된 문제로 근막통증증후군과 근육의 특정 부위 압통이 있다.

## (3) 피로 관련 대사조절

### (가) 젖산회로(혐기성)

해당과정에서 산소가 충분하지 않을 경우 젖산 탈수소효소에 의해 NADH의 2개 수소원자를 피루브산에 전이시켜 젖산으로 환원시킨다. 포도당이 젖산으로 전환되는 대사를 혐기성 호흡이라 하며, 골격근의 과격한 운동 시 과량의 젖산이 생성되고 근육의 피로가 생겨 결과적으로 근육이 손상된다.

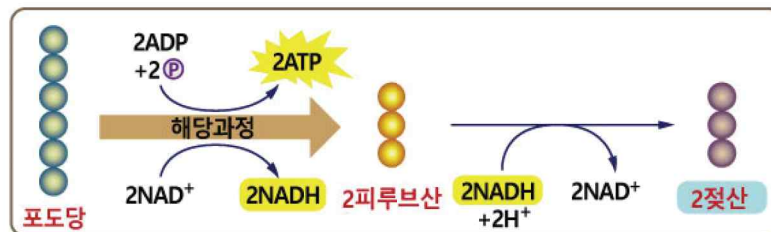


그림 1. 젖산 형성

[출처: Stuart Ira Fox, 생리학5, 라이프사이언스, 2004]

### ① 젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase, LDH)

LDH는 무산소 상태에서 피루브산로부터 젖산 형성을 촉매 하는 효소로서, 고강도 운동 시 그 활성이 증가되며, 근육 피로에 있어서 중요한 인자로 알려져 있다. 과격한 운동을 할 경우 과량의 피루브산이 생성되어 젖산 형성이 촉진되고, 또한 피루브산을 젖산으로 전환시키는 과정을 촉매 하는 LDH 활성도 증가된다.

(나) 해당작용과 시트르산 회로(호기성)

1) 해당작용

총 10단계 반응으로 이루어졌으며, ATP 투자단계와 ATP 수확단계의 두 단계로 나눌 수 있다. 투자단계에서 ATP 두 분자를 사용하고, 수확단계에서 4ATP가 생성되어 결과적으로 2분자의 ATP가 생성된다.

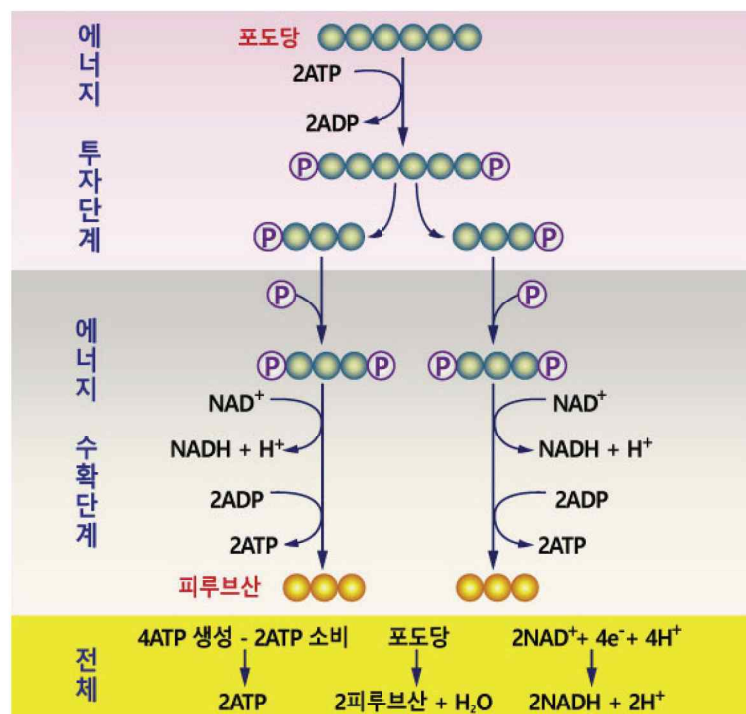


그림 2. 해당작용

[출처: Denniston, Topping, Caret. 생화학, 녹문당, 2008]

① 헥소키나아제(Hexokinase, HK)

글루코오스 기질은 한 짝의 포스포릴화 반응에서 hexokinase 효소에 의해 포스포릴화된다. 헥소키나아제(HK)는 운동 시 필요한 에너지원 생성에 관여하고 있다.

## 2) 시트르산 회로

탄수화물, 지방, 그리고 단백질에서 방출된 아미노산의 최종분해단계이며, 만약 TCA 회로가 원활하게 돌아가지 않는다면 혈중 젖산이 축적되어 피로유발의 원인이 될 수 있다.

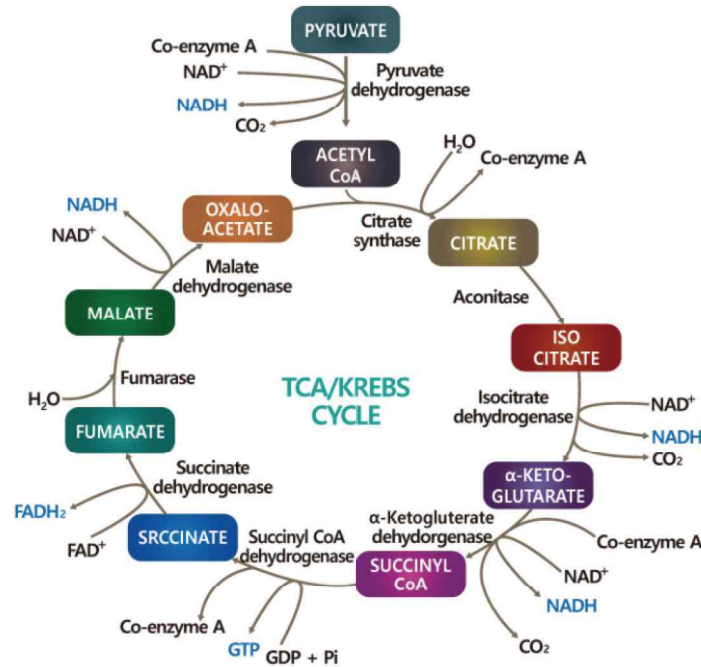


그림 3. 시트르산 회로

[출처: Denniston, Topping, Caret. 생화학, 녹문당, 2008]

### ① 시트르산합성효소(Citrate synthase, CS)

시트르산합성효소(CS)는 TCA 회로의 첫 단계에서 citrate 합성을 촉매하는 효소로서, 일반적으로 유산소성 운동에 의해 증가된다.

### ② 숙신산탈수효소(Succinate dehydrogenase, SDH)

숙신산탈수효소(SDH)는 succinate를 fumarate로 산화시키는 촉매작용을 하며, Flavin adenine dinucleotide(FAD) 산화제는 이 단계에서 환원된다.

### ③ 말산탈수소효소(Malate dehydrogenase, MDH)

시트르산 회로의 마지막 단계인 말산탈수소효소(MDH)는 NAD<sup>+</sup>를 NADH로 환원시킨 다음, malate를 oxaloacetate로 산화시키는 촉매작용을 한다.

#### (다) 호르몬

##### 1) 코르티코스테론(Corticosterone, CORT)

부신은 양측 신장의 위를 덮고 있는 한 쌍의 기관으로 피질과 수질로 구성되어 있다. 부신수질은 신경절전교감 신경섬유에 의한 자극에 반응하여 카테콜아민 호르몬을 혈액으로 분비한다. 그러나 부신피질은 신경성 자극을 받지 않고 호르몬의 자극을 받으며, 스테로이드 호르몬을 분비한다. 그 종류는 염류코르티코이드, 당류코르티코이드, 성스테로이드가 있다. 그 중 당류코르티코이드는 코르티솔(Cortisol)로 분비되며 이는 뇌하수체 전엽의 adrenocorticotrophic hormone(ACTH)에 의해 촉진된다. 당류코르티코이드의 증가는 스트레스와 연관성이 있다. 장기간 운동 시 스트레스로 인하여 뇌하수체 전엽에서 ACTH 분비를 증가시킴으로서 부신피질의 당류코르티코이드 분비가 증가하여 피로가 발생된다.

#### (4) 피로개선 관련 인자

##### (가) 혈중 대사물질 및 효소 농도

##### 1) 혈당(Blood glucose) 농도

혈중 글루코스 농도가 감소하면 피로감을 느끼게 되고, 지구력 운동 수행 능력을 저해하는 결과를 초래한다. 즉, 운동 후반부에 근육의 글리코겐 함량이 감소하면 혈중 글루코스가 근육으로 유입되는 양이 증가하는데, 이로 인해 혈중 글루코스가 고갈되는 현상이 생긴다.

##### 2) 혈중 젖산(Lactate) 농도

세포에 산소가 충분히 공급되는 상황에서는 TCA 회로가 원활히 진행되므로 혈중 젖산농도가 0.56~2.00 mmol/L의 범위로 유지되고, 그 이상으로 축적되지 않는다. 그러나 해당 작용과 TCA 회로의 대사적 연계가 당량비로 진행되지 못하고 해당 작용이 상대적으로 활발한 상황, 또는 세포에서 요구되는 산소량보다 산소 공급이 부족한 상황에서는 근육 내에 젖산이 생성된다. 또한, 고강도 운동 시 산소공급량이 근육의 산소 소모량에 미치지 못하는 경우 근육조직의 젖산농도가 증가하게 되고, 이때 생성된 젖산은 혈액으로 확산되어 심장 및 간에서 처리되는데, 운동으로 인해 젖산이 축적되면 체내 산성화가 초래되어 운동 중 글리코겐을 활성화된 포도당으로 전환시키는 효소인 포스포릴라아제(Phosphorylase) 활성이 저해되고, 결과적으로 무산소 상태에서 운동에너지의 급원이 되는 포도당 신생이

억제된다. 따라서 혈중 젖산의 감소는 근육 내 피로도를 경감시키는 주요 바이오마커로 인지되고 있다.

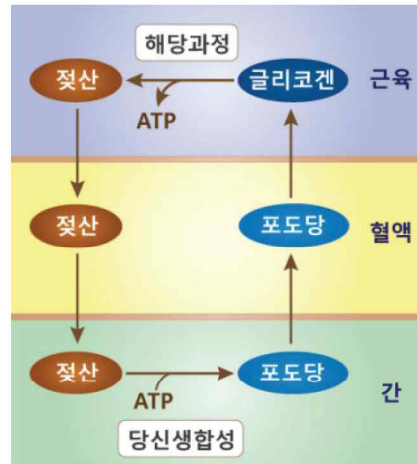


그림 5. 코리회로

[출처: Compend Contin Educ Vet 29(6):360-2, 2007]

### 3) 혈중 암모니아(Ammonia) 농도

아스파르트산은 근육 내에서 purine nucleotide 회로의 주요 구성분으로서 극심한 고강도 운동 중에 ATP 풀을 재생시켜 근육에 에너지를 제공하고, 이 과정에서 유리 암모니아를 형성한다. 운동의 강도 또는 시간에 따라 아미노산의 분해 결과 생성된 암모니아는 근육으로부터 혈액으로 방출되고, 혈중 암모니아는 뇌에 전달되어 중추 피로를 증가시킨다. 한편 근육세포 내에 축적된 암모니아는 근육의 통증 감지와 관련이 있는 구심성 신경을 자극하고, TCA cycle 및 당신생 작용을 저해하며, 젖산 생성을 초래함으로써 근육의 피로를 유발시킨다.

### 4) 혈중 말론디알데하이드(Malondialdehyde, MDA) 농도

조직손상의 지표로 사용되는 산화물로서, 다중불포화지방산이 과산화 되면서 지속적인 분열과 재배열 과정을 거쳐 상대적으로 더 안정한 carbonyl 형태의 생성물로 가게 되는 과정에서 생기는 aldehyde products중의 하나이다. 생성된 지질과산화물은 세포막 손상·파괴를 하며, 혈소판 응집, 혈관 수축을 초래한다. 또한 과산화지질혈전이 말초의 여러 조직에 장애를 유발하여 세포를 노화시키는 것으로 알려져 있다. 운동 시 운동에 따른 스트레스로 인하여 말론디알데하이드(MDA)가 증가하여 근 조직에 손상을 준다.

#### 5) 혈중 과산화물제거효소(Superoxide dismutase, SOD) 농도

Superoxide를 산소와 과산화수소( $H_2O_2$ )로 전환시키는 반응을 촉매 하는 항산화 효소로서 혈중에서 자유라디칼을 제거시키는 역할을 한다. 혈중 과산화물제거효소(SOD)의 증가는 근육 내 피로감을 감소시킨다.

#### 6) 혈중 글루타티온 과산화효소(Glutathione peroxidase, GPx) 농도

격심한 운동 시 산소 소비량이 증가되면서 유리기 생성이 증가되고 생성된 과잉의 유리기와 지질 과산화물은 단백질의 산화, DNA 손상을 일으킨다. 이때 셀레노엔자임으로 구성된 항산화 바이오마커인 글루타티온 과산화효소(GPx)가 인체의 산화적 손상으로부터 보호하는 역할을 한다.

#### 7) 혈중 유리지방산(Free fatty acid, FFA) 농도

운동 시 지방 세포로부터 혈중으로 방출되어 순환하는 유리지방산(FFA)이 가장 중요한 에너지원으로 알려져 있다. 따라서 유리 지방산은 당 생산과정을 거쳐 에너지원으로 이용되고 이는 피로도를 감소시킨다.

#### 8) 혈중 무기인산(Inorganic phosphorus) 농도

운동 중인 근육이 반복되는 근육 수축에 의해 myosin과 actin의 친화력을 높이는 단계에서 ATP가 가수 분해되고, 이로 인해 혈중 무기인산 농도가 급격히 증가하게 된다. 일반적으로 운동 중에 혈청 무기인산 농도가 급격히 증가하면 근섬유의 cross-bridge가 약화되면서 힘 생성이 저하된다.

#### 9) 사이토카인(IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ )

사이토카인은 표적세포의 세포막에 존재하는 특이적인 수용체에 결합하고 신호전달 경로를 활성화하여 궁극적으로 효소활성이나 유전자의 발현을 변화시킨다. 운동으로 인하여 증가된 사이토카인은 근조직의 염증반응을 일으킬 수 있다.

## (나) 근육 중 대사물질 및 효소 농도

### 1) 근육 글리코젠(Glycogen) 함량

근육에 저장된 글리코젠은 고강도의 지구력 운동 시 가장 주요한 에너지원으로, 운동 중 혈중 포도당 농도가 감소되고, 감소된 양을 근 글리코젠 양으로 보충할 수 없다면 피로가 유발된다. 따라서 운동 후 회복기간 동안 근육 내에 글리코젠을 효율적으로 재충전시키는 것은 다음 운동수행의 향상을 위한 중요 요인이다.

### 2) 근육 크레아틴인산효소(Creatine kinase, CK) 활성

근육에 많이 존재하는 효소로서, 근육세포들이 손상될 때 혈액으로 방출되어 에너지원을 생성한다. 크레아틴인산효소(CK)는 운동 중인 근육 세포에서 무산소 시 ATP 재합성(ADP와 phosphocreatine으로부터 ATP를 합성하는 과정)에 필요한 creatine phosphate를 합성하는 역할을 한다.

### 3) 미오글로빈(Myoglobin) 함량

산화적 인산화를 통한 ATP 공급은 충분한 산소의 공급을 위해 모세혈관의 발달과 미오글로빈의 높은 함량을 요구하게 된다. 미오글로빈은 산소를 근육세포내의 에너지 생성 소기관인 미토콘드리아로 이동시켜 에너지원 생성에 이용 되도록 한다.

## (다) 뇌 조직 중 대사물질 및 효소 농도

### 1) 세로토닌(Serotonin) 활성

5-히드록시트립타민(5-hydroxytryptamine, 5-HT)이라고 불리며, 뇌간의 정중선에 따라 위치한 봉선 핵을 갖고 있는 뉴런에 의해 신경전달물질로서 사용된다. 장기간 운동으로 인하여 지방 분해가 활성화되어 혈중 유리 지방산의 농도가 증가하게 되고, 알부민과 트립토판의 결합률이 감소함에 따라 혈장 유리트립토판의 농도가 증가하게 된다. 이때 세로토닌의 전구물질인 트립토판의 뇌 유입이 증가되어 뇌에서 세로토닌이 증가하면, 중추 신경계의 피로가 유발되어 운동 수행 능력을 감소시키는 중추적 피로 유발 요인이 될 수 있다.

## 2) 도파민(Dopamine) 활성

신경전달물질로 사용하는 뉴런을 도파민 작동성 뉴런이라고 하며, 도파민 작동성 뉴런의 세포체는 중뇌에 다량으로 존재한다. 이 뉴런의 축삭은 두 개의 시스템으로 나누어지는데, 운동 통제에 관여하는 흑질선조체 도파민 시스템과 정서적 보상에 관여하는 중대뇌변연계 도파민 시스템이다. 흑질선조체 도파민 시스템 세포체는 멜라닌 색소를 갖고 있기 때문에 흑질이라고 부르고 중뇌에 있다. 흑질은 운동에 주된 작용을 하는 기저핵의 일종으로 도파민을 생성하며 신경섬유를 선조체에 보내어 선조체에서 도파민을 유리시킨다. 이 흑질-선조체 신경계는 정상 운동을 위해 매우 필요한 신경조직이다. 도파민의 합성은 티로신의 활성화에 의존하며 운동 시 도파민 신경전달의 감소는 피로를 유발시킨다.

### Ⅲ 기능성 시험 방법

#### 1. 바이오마커의 선정

##### (1) 연구유형별 바이오마커

피로개선 기능성을 확인하기 위해 측정 가능한 시험의 연구 유형별 바이오마커(biomarker)는 표 1과 같다.

표 1. 피로개선 기능성 확인을 위한 바이오마커

| 구분         |                        | 바이오마커                        | 측정 가능한 연구유형 |         |       |
|------------|------------------------|------------------------------|-------------|---------|-------|
|            |                        |                              | In vitro    | In vivo | Human |
| 피로개선<br>기전 | 에너지 공급                 | Blood Glucose                |             | ○       | ○     |
|            |                        | Free fatty acid              |             | ○       | ○     |
|            |                        | Hexokinase(HK)               | ○           | ○       |       |
|            |                        | Citrate synthase(CS)         | ○           | ○       |       |
|            |                        | Succinate dehydrogenase(SDH) | ○           | ○       |       |
|            |                        | Malate dehydrogenase(MDH)    | ○           | ○       |       |
|            |                        | Glycogen                     |             | ○       |       |
|            | 근육 손상<br>회복            | Cell survival rate           | ○           |         |       |
|            |                        | Creatine kinase(CK)          | ○           | ○       | ○     |
|            |                        | Lactate                      |             | ○       | ○     |
|            |                        | Lactate dehydrogenase(LDH)   | ○           | ○       |       |
|            |                        | Ammonia                      |             | ○       | ○     |
|            |                        | Inorganic phosphorus         |             | ○       | ○     |
|            |                        | Myoglobin                    |             | ○       | ○     |
|            |                        | 표면근전도 검사                     |             |         | ○     |
|            | 항산화 개선<br>및 염증 억제      | MDA, SOD 등 항산화 관련 지표         |             | ○       | ○     |
|            |                        | Cytokine                     |             | ○       | ○     |
|            | 호르몬 및<br>신경전달<br>물질 조절 | Corticosterone(CORT)         |             | ○       | ○     |
|            |                        | Serotonin                    |             | ○       |       |
|            |                        | Dopamine                     |             | ○       |       |
|            |                        | Monoamine oxidase            |             | ○       |       |
|            |                        | Growth hormone               |             | ○       | ○     |

| 구분        |            | 바이오마커                     | 측성 가능한 연구유형 |         |       |
|-----------|------------|---------------------------|-------------|---------|-------|
|           |            |                           | In vitro    | In vivo | Human |
| 임상적<br>개선 | 운동수행<br>능력 | 운동지속시간(Exercise duration) |             | ○       | ○     |
|           |            | Peak torque/body wt       |             |         | ○     |
|           |            | Average power             |             |         | ○     |
|           | 피로도 개선     | 운동 수행 후 통증                |             |         | ○     |
|           |            | 피로도 설문                    |             |         | ○     |
|           |            | 수면의 질                     |             |         | ○     |

## (2) 바이오마커 설명

항산화 관련 바이오마커는 항산화시스템, 활성산소 수준, 산화에 의한 손상 기전 관련 바이오마커로 구분되어 있다.

### (가) 에너지 공급

#### 1) 혈당(Blood glucose)

혈중 포도당 농도가 감소하고, 산소의 부족으로 인하여 당 생성과정이 저해될 경우 젖산 생성의 증가로 인하여 피로감을 느끼게 되고, 지구력 운동 수행 능력이 저해된다.

#### 2) 유리지방산(Free fatty acid, FFA)

지방세포에 저장되어있는 중성지방으로부터 분해된 유리지방산은 운동 시 에너지원으로 이용된다. 혈중으로 유리된 유리지방산은 알부민이 결합된 형태로 간과 골격근으로 운반된다. 간으로 운반된 유리지방산은 중성지방합성의 기질로 이용되고, 근육에서는 에너지원으로 사용된다. 따라서 에너지원인 유리 지방산 사용의 증가는 피로도 감소를 의미한다.

#### 3) 헥소키나아제(Hexokinase, HK)

해당과정에서 포도당을 포도당-6-인산으로 인산화하는 효소로 포도당을 분해하여 피루브산과 ATP 생성에 관여하는 효소이다. 헥소키나아제의 활성은 원활한 해당작용을 통한 지속적인 에너지 공급으로 피로가 생성되는 것을 방지할 수 있다.

#### 4) 시트르산합성효소(Citrate synthase, CS)

CS는 TCA 회로의 첫 단계에서 citrate 합성을 촉매 하는 효소로, TCA회로가 원활하게 돌아가지 않는다면 혈중 젖산이 축적되어 피로유발의 원인이 된다.

#### 5) 숙신산탈수효소(Succinate dehydrogenase, SDH)

호박산염을 푸마르산염으로 산화 촉매작용을 하여 Flavin adenine dinucleotide (FAD) 산화제는 이 단계에서 환원된다. TCA회로가 원활하게 돌아가지 않는다면 혈중 젖산이 축적되어 피로유발의 원인이 된다.

#### 6) 말산탈수소효소(Malate dehydrogenase, MDH)

말산탈수소화효소는 시트르산 회로의 마지막 단계에서  $NAD^+$ 를 NADH로 환원반응 시키며 말산염을 옥살로 아세테이트로 산화반응하는 과정에서 촉매 작용을 한다. TCA회로가 원활하게 돌아가지 않는다면 혈중 젖산이 축적되어 피로유발 원인이 된다.

#### 7) 글리코젠(Glycogen)

글리코젠은 간(2~10%)과 골격근(1~2%)에 저장되며 간에서 저장된 글리코젠은 주로 뇌, 신장 등에서 사용된다. 고강도의 지구력 운동 시 간의 글리코젠이 고갈되면 근육 글리코젠이 에너지원이 된다. 따라서 에너지원인 글리코젠의 증가는 피로도 감소로 의미한다.

### (나) 근육 손상 회복

#### 1) 세포 생존율(Cell survival rate)

세포에 시험물질을 처리한 후의 생존개체 수를 작용 전의 최초 개체 수에 대한 비율로 나타내는 값이다.

#### 2) 크레아틴인산효소(Creatine kinase, CK)

CK는 크레아틴과 ATP에 의하여 크레아틴인산을 생성하는 반응을 촉매하는 효소이다. 근육에 많이 존재하고 인체 세포가 직접적으로 사용하는 에너지원인 ATP를 생성한다. 또한 근조직이 손상되면 세포막 투과성이 증가하고, CK가 세포 간질액으로 이동하여 혈중 농도가 높아진다. 혈중 CK 농도는 근 손상을 평가하는 지표로 사용된다.

### 3) 젖산(Lactate)

강도 높은 운동 시 근육에 대한 산소 공급이 해당과정 속도를 따라 갈 수 없을 때, 피루브산이 젖산탈수소효소에 의해서 젖산으로 전환된다. 젖산의 축적으로 인체가 산성화되면 세포내 pH를 떨어뜨리게 되고 이로 인해 효소의 활성이 감소하게 되어 미토콘드리아의 산화 및 근육의 이완과 수축활동이 억제된다. 따라서 갑자기 심한 운동을 하는 경우, 세포내 pH가 낮아짐에 따라 근육통이 초래될 수 있다.

### 4) 젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase, LDH)

젖산탈수소효소는 근육활동 중 무산소해당계에 의해 ATP를 생산하는 필수 효소로서 피루브산과 젖산의 반응을 촉매 하는 효소로 주로 적혈구와 근세포에 존재한다. 심한 육체운동에 의한 직접적인 세포막의 파괴 및 조직괴사, 스트레스에 의한 지질과산화 등에 의하여 세포막 투과성이 증가되면 세포질 내의 LDH가 혈중으로 방출되며, 혈중 LDH 농도는 근 손상의 지표로 사용된다.

### 5) 암모니아(Ammonia)

암모니아는 adenine nucleotide(ATP, ADP, AMP)가 IMP로 분해되는 과정에서 발생한다. 높은 암모니아 축적 시에는 기면상태, 경련, 운동실조, 혼수상태 등을 일으킬 수 있으며, 운동 시 갑자기 증가되는 암모니아는 중추신경 세포내 pH 변화, 세포 내외의 전해질 농도변화, 신경전달물질 농도 변화 등에 의해 운동기능의 장애와 피로가 발생할 수 있다.

### 6) 무기인산(Inorganic phosphorus)

강한 강도의 운동 시 빠른 포스포크레아틴 가수분해는 무기인산의 축적을 유발한다. 무기인산의 증가는 근육의 힘 생성을 위한 cross-bridge의 비율을 감소시켜 힘 생성의 저하를 야기한다.

### 7) 미오글로빈(Myoglobin)

미오글로빈은 근세포 속에 있는 적색을 띤 헴단백질로 생체 내 역할은 근조직 속에 산소를 확보하는 저장체이다. 헤모글로빈과 성질, 헴 함량, 입체구조 등이 비슷하나 헤모글로빈에 비해 산소에 대한 친화성이 크며, 산소를 포함한 미오글로빈의 증가는 피로 감소를 의미한다. 또한, CK와 함께 근 손상을 평가할 수 있는 지표로 이용된다.

## 8) 표면근전도 검사

인간의 뇌는 명령을 내릴 때 미세 전압을 신경을 통해 흘려줌으로써 해당 근육의 움직임을 조정한다. 따라서 신호 체계 말단부 근육에서 미세 전압을 측정하면, 문제를 파악할 수 있다. 근전도는 근육이 수축할 때 생기는 전위차를 파형으로 기록한 것이며, 근육의 피로도가 증가하게 되면 주파수가 감소하게 된다.

### (다) 항산화 개선 및 염증 억제

#### 1) MDA, SOD 등 항산화 관련 지표

산화스트레스는 근육조직에서 근육 내 피로감을 생성하는 주요물질이며, 이를 측정하는 MDA(Malondialdehyde)는 지질과산화물로서 운동 시 활동근육의 산소소비증가로 인하여 free radical이 생성된다. 이외에도 산화스트레스와 관련된 항산화효소로는 SOD(Superoxide dismutase), GPx(Glutathione peroxidase) 등이 있다. SOD는 초과산화이온을 산소와 과산화수소로 바꿔줌으로써 독성으로부터 세포를 방어하며, GPx는 셀레노엔자임로 구성된 항산화 효소로서, 과산화수소를 환원시켜 물( $H_2O$ )을 생성하며, 세포 내에서 과산화수소( $H_2O_2$ )의 축적을 방지하도록 도와준다.

#### 2) 사이토카인(IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ )

사이토카인은 세포사이의 신호전달을 매개하는 단백질로서, 인터루킨(Interleukin; IL), 인터페론(Interferon; IFN), 종양괴사인자(Tumor necrosis factors; TNF) 등이 있다. 운동 시 증가된 사이토카인은 독성활성과 관련이 있다. 이러한 변화들은 근육 분해에 의해서 유발되는 염증성 반응에 영향을 미치며, 조직 손상, 감염 및 염증을 유발할 수 있다.

### (라) 호르몬 및 신경전달물질

#### 1) 코르티코스테론(Corticosterone, CORT)

스트레스 시 뇌하수체 전엽에서 부신피질 자극 호르몬(ACTH; Adrenocorticotrophic hormone) 분비를 증가시킴으로서 부신피질의 당류코르티코이드 분비가 증가한다. 이는 기관과 물리적 변화를 일으키며, 항상성 유지를 저해시킨다.

## 2) 세로토닌(Serotonin)

세로토닌(Serotonin)은 5-히드록시트립타민(5-hydroxytryptamine, 5-HT)으로 불리며, 뇌간의 정중선에 따라 위치한 봉선 핵을 갖고 있는 뉴런에 의해 신경전달물질로서 사용된다. 운동을 통한 세로토닌 농도의 증가는 뇌에서의 중추피로를 유발시킴으로써 운동을 지속하려는 의지를 상실시킨다.

## 3) 도파민(Dopamine)

도파민(Dopamine)은 신경전달물질의 하나로 노르에피네프린과 에피네프린의 전구 물질이다. 운동 중 도파민은 심리적 각성상태를 유지시켜줌으로써 중추피로를 억제한다. 즉, 신체적 운동 시 도파민 신경전달의 감소는 피로를 유발시킨다.

## 4) 모노아민 산화효소(Monoamine oxidase, MAO)

모노아민 산화효소(MAO)는 중추신경계나 말초조직 등 동물조직 중의 mitochondria에 널리 존재하는 신경 전달물질로 호르몬성 아민(amines) 화합물의 대사를 관장하는 효소이다. 체내 조직의 serotonin 농도를 조절하는 효소인 MAO의 효소활성을 억제하면 피로회복 효과를 기대할 수 있다.

## 5) 성장호르몬(Growth hormone)

뇌하수체에서 분비되는 성장호르몬(Growth Hormone, GH)은 시상하부의 신경분비 핵(Neurosecretory Nuclei)에 분비되는 성장호르몬방출호르몬(Growth Hormone-releasing Hormone, GHRH)과 성장호르몬억제호르몬(Growth Hormone-inhibiting Hormone, GHIH)에 의해 조절된다. GHRH, GHIH는 신경호르몬(Neurohormone)으로 인체의 많은 자극에 의해 시상하부에서 분비를 조절한다. 혈중 아미노산 증가, 혈중 지방산 감소, 혈당 감소, 운동, 적절한 스트레스, 적절한 수면이 나타나게 되면 시상하부와 뇌하수체를 통해서 성장호르몬이 박동성분비를 한다. 따라서 성장호르몬은 적절한 수면으로 인한 피로개선의 지표로 사용될 수 있다.

## (마) 운동수행능력

### 1) 운동지속시간(Exercise duration)

운동수행능력이란 근력을 이용하여 운동을 수행하는 능력을 말한다. 근육은 우리가 섭취한 음식물로부터 체내에서 만들어지는 에너지의 형태인 ATP 에너지를 사용하는데 근육 내부에 존재하는 ATP의 양은 아주 적기 때문에 그것만 가지고는 1초 이상의 근수축이 이루어질 수 없다. 그러나 실제로는 장시간에 걸쳐 운동을 지속할 수 있는데, 그것은 ATP 에너지의 분해 후에 생성되는 ADP가 ATP로 재합성되기 때문이다. 이 에너지를 다시 합성하기 위해서는 세포질내의 인산크레아틴을 인산과 크레아틴으로 분해하면서 생기는 에너지를 사용한다. 그러므로 ATP 에너지나 인산크레아틴이 원활히 공급되거나, 근육을 많이 사용할수록 근력 및 운동수행능력을 향상하는데 도움이 된다. 따라서 운동지속시간을 측정하면 피로도 개선을 통한 운동수행능력의 개선 정도를 알 수 있다. 운동지속시간은 수영, 러닝(Treadmill), 원통 구르기(Rotarod test) 등의 검사를 통해 측정할 수 있다.

### 2) 최대토크/ 체중(Peak torque/body wt)

최대토크(Peak torque)는 관절 가동범위 내에서 동작 수행에 있어 측정 근육 군이 발휘한 토크 곡선 중 가장 높은 지점을 의미하는 것이며, 이 값을 최대근력 값으로 사용하며 체중에 대비한 상대값(Peak torque/body weight%)을 보편적으로 사용하고 있다. 최대토크는 인체의 움직임 상태인 동적상태의 근력을 의미하며 각속도, 성별, 중력 보정값 등에 따라 차이를 나타낼 수 있으며, 주동근의 근력 및 근 파워를 평가 분석하는데 주요지표로 사용되고 있다.

### 3) 평균파워(Average power)

운동수행능력을 평가함에 있어 최대토크와 함께 쓰는 지표가 평균파워(Average power)이다. 시험물질 섭취에 따른 최대토크와 평균파워의 변화를 측정하면 시험물질의 피로개선여부를 판단할 수 있다.

## (바) 피로도 개선

### 1) 운동 수행 후 통증

시험물질 투여 여부에 따른 운동 수행 후의 통증(Hamstring curl, leg extension, biceps curl, triceps extension, lateral pull soreness 정도)을 비교하면 시험물질의 피로개선 효과를 측정할 수 있다.

### 2) 피로도 설문

#### ① VAS(Visual analog scale)

시험제품 사용에 의한 피로도의 변화를 확인하기 위하여 방문주차별 피로도에 대한 설문을 통해 피로도 개선여부를 판단할 수 있다. 피로도에 대한 설문은 시각사상척도(Visual Analogue Scale, VAS)를 이용한다.

### 3) 수면의 질

피로는 개인의 주관적인 느낌으로 신체나 심리적 스트레스의 척도가 되며 수면이나 휴식부족, 질병 등으로 발생할 수 있다. 건강한 성인의 피로도는 수면의 시간보다는 수면의 질과 더 관련이 있다고 알려져 있다. 따라서, 수면의 질을 측정함으로써 시험물질의 피로도 개선효과 유무를 판단할 수 있다.

## 2. 주요 바이오마커의 측정 방법

### (가) 에너지 공급

#### 1) 혈당(Blood glucose)

혈당 분석은 채취한 혈액을 상용화된 kit를 이용하여 UV-spectrometer로 측정한다.

#### 2) 유리지방산(Free fatty acid, FFA)

유리지방산 분석은 채취한 혈액을 원심분리기를 이용하여 원심분리한 후, 상용화된 kit를 이용하여 UV-spectrometer로 흡광도를 측정한다.

#### 3) 헥소키나아제(Hexokinase, HK)

반응 완충용액,  $MgCl_2$ , ATP, unit Glucose-6-phosphate dehydrogenase에 (A) glucos, (B) N-acetylglucosamine와 조직추출물, 증류수를 각각 넣어 반응시킨다. 반응 후 분광광도계를 사용하여 흡광도 변화를 측정한 다음 (B)-(C)=HK 활성으로 측정한다.

#### 4) 시트르산합성효소(Citrate synthase, CS)

일정량의 근육조직을  $KHPO_4$  완충용액에 균질화한 후 미토콘드리아 막을 파괴하기 위하여 동결 용해시킨 후,  $KHPO_4$ , acetyl COA, DTNB 근육효소 액을 각기 혼합한 후 흡광도를 측정하고, 여기에 다시 oxaloacetate를 반응시켜서 흡광도 변화를 측정한다.

#### 5) 숙신산탈수효소(Succinate dehydrogenase, SDH)

KCl용액으로 homogenate를 만든 후 냉동 침기를 사용하여 원침하고 그 상등 액을 원침 하여 미토콘드리아 침전물을 얻고, 이 침전물을 소량의 KCl 용액으로 다시 homogenate 한 후 재원침하여 얻은 침전물을 KCl 용액으로 homogenate를 만들고, 이것을 phosphate buffer용액으로 희석한 것을 효소원으로 사용하였다. 반응 액을 실온에서 방치한 후 흡광도 변화를 Spectrophotometer를 사용하여 관찰하고 산화형 DICPIP(2,6-dichlorophenolindophenol)의 감소량을 추정하여 SDH 활성을 측정 한다.

## 6) 말산탈수소효소(Malate dehydrogenase, MDH)

Isolation buffer에 넣고 homogenizer로 homogenization 한 후, 원심 분리하여 상층 액을 수거한다. 이 상층 액을 원심분리 후, 미토콘드리아 침전물을 얻는다. 미토콘드리아 침전물에 potassium phosphate buffer를 넣는다. 위의 용액을 sonicator tube에 넣은 후, 얼음에 박고, 파쇄 하여 막을 깬 후 파쇄 액을 사용하여 malate dehydrogenase 활성을 측정한다. glycine 용액에 파쇄한 sample solution을 넣고, malic acid와  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>를 첨가한 후 흡광도 변화를 측정한다.

## 7) 글리코겐(Glycogen)

실험동물 희생 후, 액체질소 하에서 간 또는 근육(비복근, 가자미근 등) 샘플을 채취하여 KOH용액을 넣어 가열, 분해 한 후 에탄올(ethanol)로 탄수화물을 침전 후 원심 분리하여 침전물을 회수한다. 이 침전물에 일정량의 증류수를 첨가하여 희석시킨 후 phenol용액을 넣어 발색시켜서 반응시킨다. 표준 포도당 용액을 이용하여 흡광도를 측정한다.

### (나) 근육 손상 회복

#### 1) 세포 생존율(Cell survival rate)

근육세포 생존율은 MTT법 등을 이용하여 측정한다. MTT법은 세포의 미토콘드리아 내 효소인 succinate-dehydrogenase에 의해 MTT가 formazan으로 변하여 세포의 성장이 멈추거나 세포가 죽으면 formazan의 생성이 줄어들게 되는 것을 이용한 것이다. 세포 생존율을 측정하기 위해 96-well plate에 각 well당 일정량의 세포를 분주하여 24시간 배양 후 배양액을 제거하고 fetal bovine serum이 포함되지 않은 배양액을 분주한 뒤, 시험물질을 여러 농도로 처리한다. 일정시간 후, MTT reagent를 분주하여 배양한 다음 상층액을 제거하여 DMSO를 첨가하고, 배양시켜 생성된 formazan을 완전히 녹여준 다음 흡광도를 측정한다.

#### 2) 크레아틴인산효소(Creatine kinase, CK)

채취한 혈액이나 조직 상층 액을 원심분리기를 이용하여 원심분리한 후 상용화된 kit를 이용하여 UV-spectrometer로 흡광도를 측정한다.

### 3) 젖산(Lactate)

젖산의 분석은 채취한 혈액을 원심분리기를 이용하여 원심분리한 후 상용화된 kit를 이용하여 UV-spectrometer로 측정한다.

### 4) 젖산탈수소효소(Lactate dehydrogenase, LDH)

젖산탈수소효소는 assay kit 등을 이용하여 측정한다. 시험물질을 섭취한 실험동물의 혈액을 원심분리한 후 상등액을 취하여 LDH assay kit를 사용하여 젖산탈수소효소 양을 측정한다.

### 5) 암모니아(Ammonia)

암모니아는 Berthlot법, Assay kit 등을 이용하여 측정한다.

#### ① Berthlot 법

혈중 암모니아를 생성할 수 있는 효소의 활성을 소실시키는 제단백 용액 2mL에 혈액 1mL를 첨가하여 원심분리 후, 상등액을 분리하여 phenol 4%, nitroprussidedua 0.015%, KOH 4.1%를 첨가하여 알칼리성으로 만든 후 탄산칼륨 28%와 염소산칼륨 3%가 함유되어있는 시약을 사용하여 발색시킨 후 UV-spectrometer로 흡광도를 측정한다.

#### ② Assay kit

채취한 혈액을 원심분리기를 이용하여 원심분리한 후, 상용화된 kit를 이용하여 UV-spectrometer로 측정한다.

### 6) 무기인산(Inorganic phosphorus)

무기인산의 분석은 채취한 혈액을 원심분리기를 이용하여 원심분리한 후 생화학분석기로 측정하거나 상용화된 kit를 이용하여 UV-spectrometer로 흡광도를 측정한다.

### 7) 미오글로빈(Myoglobin)

미오글로빈은 채취한 혈액이나 소변을 원심분리기를 이용하여 원심분리한 후 상용화된 kit를 이용하여 측정할 수 있다.

## 8) 표면근전도 검사

근전도는 근육이 수축할 때 생기는 전위차를 파형으로 기록한 것으로, Pre-gelled bipolar surface electrodes를 이용하여 외측광근 뒷부분과 대퇴골 괴상돌기의 중간부위에서 2분간 페달을 돌리고 4분간 중지할 때 측정하여 전위차 변화를 평균치를 이용하여 계산한다.

### (다) 항산화 개선 및 염증 억제

#### 1) MDA, SOD 등 항산화 관련 지표

MDA 농도 측정방법에는 HPLC, GC등 여러 방법이 있지만, 주로 상용화된 kit를 이용한 TBARS 법을 사용하고 있다. TBARS-MDA( $\text{OHC-CH}_2\text{-CHO}$ )가 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하여 형성하는 분홍색의 발색 복합체인 MDA-(TBA)<sub>2</sub>의 양을 측정한다.

SOD와 GPx의 분석은 적출한 조직의 상층액이나 채취한 혈액을 원심분리기를 이용하여 원심분리한 후 생화학분석기로 측정하거나 상용화된 kit를 이용하여 UV- spectrometer로 흡광도를 측정한다.

#### 2) 사이토카인(IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ )

사이토카인은 ELISA, PCR 등을 이용하여 측정한다.

##### ① ELISA

항체를 coating 용액에 희석하여 micro well에 코팅한 후 4℃에서 overnight 한다. 각 well을 washing 용액으로 세척한 후 시험물질을 섭취한 실험동물의 균질화 된 조직 상층액이나 혈액을 분주한다. 실온에서 방치한 다음 washing 용액으로 세척하고, antibody Avidin-HRP conjugated를 처리한다. 실온에서 방치 및 세척한 다음 TMB 기질을 분주하여 어두운 곳에서 방치한 후 stop 용액을 넣고 흡광도를 측정한다.

##### ② PCR

시험물질을 식이섭취 시킨 실험동물의 조직을 적출하여 Trizol을 넣어 균질기로 분쇄하고 chloroform을 첨가·방치한 후 원심분리 한다. 상층액을 회수하여 2- propanol을 혼합하여 방치한다. 이를 다시 원심분리한 후 80% 에탄올로 세척하여 건조시킨다. 추출한 RNA는

DEPC(Diethyl pyrocarbonate)를 물에 녹여 first strand cDNA로 합성한다. 합성된 cDNA에 사이토카인의 primer를 반응시켜 타겟 유전자를 증폭한 후 유전자 발현량을 분석한다.

## (라) 호르몬 및 신경전달물질

### 1) 코르티코스테론(Corticosterone, CORT)

코르티코스테론은 RIA, HPLC 등을 이용하여 측정한다.

#### ① Radioimmune assay(RIA)

Radioimmune assay(RIA)를 이용하여 코르티코스테론(corticosterone) 항체가 코팅된 시험관에 혈청과 I125가 결합된 reagent를 분주하고, 분주된 시험관을 혼합한 다음, 반응시켜 시험관 안에 있는 모든 reagent를 제거한 후 이를 gamma counter로 측정한다.

#### ② HPLC

실험동물의 조직을 균질화 한 다음, 초음파 처리하여 원심분리 한다. 여기에서 얻은 상층액을 취하여 HPLC를 이용하여 분석한다.

### 2) 세로토닌(Serotonin)

세로토닌은 미세투석법(Microdialysis), HPLC, 면역조직화학법(IHC) 등을 이용하여 측정한다.

#### ① 미세투석법(Microdialysis)

실험동물을 마취시킨 후 수술대에 고정시키고, microdialysis probe를 삽입할 부위의 두피를 절개한다. 현미경을 이용하여 guide cannula를 설치한다. 수술을 마친 실험동물은 회복기를 지낸 후, guide cannula를 통하여 미세투석법을 위한 microdialysis probe를 삽입하고, microdialysis system에 연결한다. microdialysis injection pump를 이용하여 인공뇌척수액을 probe에 관류한다. 케이지속의 실험동물이 자유로이 움직이는 상태에서 뇌의 분석물질을 probe 끝의 반투과성 막의 확산원리에 의하여 세포외액을 취한다. 이를 HPLC를 이용하여 분석한다.

## ② HPLC

실험동물의 뇌 조직을 균질화 한 다음, 초음파 처리하여 원심분리 한다. 여기에서 얻은 상층액을 취하여 HPLC를 이용하여 분석한다.

## ③ 면역조직화학법(IHC)

실험동물에서 혈액을 채취하고 뇌 조직을 적출하여 고정액에 담가 고정한다. Free-floating 방법으로 고정된 뇌 조직은 30% sucrose용액에 넣고 24시간 이상 침적시킨 후 꺼내어 동결절편기를 이용하여 일정한 두께의 연속 가로 동결절편을 제작한다. 조직절편에 과산화수소( $H_2O_2$ )를 처리하여 내인성 과산화효소를 제거하고 normal goat serum으로 처리한다. 희석한 1차 항체를 4℃에서 수 시간 동안 반응시킨 후 세척한다. 2차 항체를 반응시킨 후, avidin biotin complex(ABC)를 처리하고, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)로 발색시킨다.

## 3) 도파민(Dopamine)

도파민은 미세투석법(Microdialysis), HPLC, 면역조직화학법(IHC) 등을 이용하여 측정한다.

## ① 미세투석법(Microdialysis)

실험동물을 마취시킨 후 수술대에 고정시키고, microdialysis probe를 삽입할 부위의 두피를 절개한다. 현미경을 이용하여 guide cannula를 설치한다. 수술을 마친 실험동물은 회복기를 지낸 후, guide cannula를 통하여 미세투석법을 위한 microdialysis probe를 삽입하고, microdialysis system에 연결한다. microdialysis injection pump를 이용하여 인공뇌척수액을 probe에 관류한다. 케이지속의 실험동물이 자유로이 움직이는 상태에서 뇌의 분석물질을 probe 끝의 반투과성 막의 확산원리에 의하여 세포외액을 취한다. 이를 HPLC를 이용하여 분석한다.

## ② HPLC

실험동물의 뇌 조직을 균질화 한 다음, 초음파 처리하여 원심분리 한다. 여기에서 얻은 상층액을 취하여 HPLC를 이용하여 분석한다.

### ③ 면역조직화학법(IHC)

실험동물을 희생시킨 동물에서 혈액을 채취하고 뇌 조직을 적출하여 고정액에 담가 고정한다. Free-floating 방법으로 고정된 뇌 조직은 30% sucrose 용액에 넣고 24시간 이상 침적시킨 후 꺼내어 동결절편기를 이용하여 일정한 두께의 연속 가로 동결절편을 제작한다. 조직절편에 과산화수소( $H_2O_2$ )를 처리하여 내인성 과산화효소를 제거하고 normal goat serum으로 처리한다. 희석한 1차 항체를 4℃에서 수 시간 동안 반응시킨 후 세척한다. 2차 항체를 반응시킨 후, avidin biotin complex(ABC)를 처리시키고, 3,3'-diaminobenzidin tetrahydrochloride(DAB)로 발색시킨다.

### 4) 모노아민 산화효소(Monoamine oxidase, MAO)

혈청 MAO의 저해활성은 benzylamine을 기질로 사용하여 37℃에서 3시간 반응시키는 동안 생성된 benzaldehyde를 비색하는 방법으로 측정한다.

### 5) 성장호르몬(Growth hormone)

성장호르몬은 상용화된 kit를 사용하여 면역방사계수측정법(Immunoradiometric assay, IRMA)으로 분석한다.

## (마) 운동수행능력

### 1) 운동지속시간(Exercise duration)

#### ① 수영

실험동물 체중의 5%의 무게에 해당되는 물질을 꼬리에 부착하고 수조에 빠트린다. 수영시간은 실험동물이 수영시작부터 물에 완전히 가라앉아 7초 동안 떠오르지 못하는 시점까지 측정하여 지구력을 측정한다.

#### ② 러닝(Treadmill)

트레드밀(Treadmill) 상태에서 탈진할 때까지의 주행시간을 측정한다. 탈진상태는 실험동물이 주행 중에 트레드밀에서 떨어지는 시점으로 한다.

#### ③ 원통 구르기 검사(Rotarod test)

실험동물을 회전하는 rotarod 장치에서 1분 이상 위치할 때까지 훈련시킨다. 시험물질을 투여 후 rotarod 장치에서 실험동물이 낙하하기까지 걸린 시간을 측정한다.

## 2) Peak torque/body wt 및 Average power

### ① Physical performance test

0.5시간에서 10초간의 최대 페달 수와 2시간 때의 최대페달수를 측정하여, 페달 스피드 감소를 통한 피로도를 측정한다. Torque 계산 방법은 남자의 경우 몸무게의 8.5%, 여자의 경우, 몸무게의 7.5%로 한다. Average power는 1km 구간 마다 페달링 평균파워(average power)를 측정하여 구한다.

### (바) 피로도 개선

#### 1) 운동 수행 후 통증

시험물질 투여 여부에 따른 운동 수행 후의 통증(Hamstring curl, leg extension, biceps curl, triceps extension, lateral pull soreness 정도)을 비교하면 시험물질의 피로개선 효과를 측정할 수 있다.

#### 2) 피로도 설문

##### ① VAS(Visual analog scale)

주관적인 판단으로 운동 전, 중간, 운동 후로 나누어 피로도를 0부터 100으로 보았을 때 어느 정도 수준인지를 평가한다.

#### 3) 수면의 질

##### ① 피츠버그 수면의 질 지표(Pittsburgh Sleep Quality Index, PSQI)

피츠버그 수면의 질 평가 도구는 국내외적으로 가장 널리 사용하고 있는 도구 중 하나로 총 19문항으로 이루어진 자가 보고 형식의 설문지이다. 지난 한 달간의 수면시간과 입면에 걸리는 시간(sleep latency), 주관적인 수면의 질(subjective sleep quality), 수면 지속시간(sleep duration), 일상적인 수면의 효율성(habitual sleep efficiency), 수면과 관련된 문제(sleep disturbance), 수면 약물 사용(use of sleeping medication), 낮 동안의 기능 부전(daytime dysfunction) 등 7개의 구성요소로 평가할 수 있다. 추가로 함께 사는 사람이 측정하는 5문항은 포함시키지 않고 임상정보를 얻는데 활용한다. 총점은 각 문항의 점수화 방법에 따라 0~21점 사이가 되며, 점수가 높을수록 수면의 질이 나쁜 것을 의미한다. PSQI 는 주관적인 수면의 질을 평가하여 '수면문제 있음(bad sleepers)'과 '수면 문제없음(good sleepers)'으로 구분할 수 있다. 5점 이상인 경우 '수면 문제 있음'으로 판별한다.

### 3. 시험 설계 시 고려사항

#### 가. 시험관 시험

##### (1) 시험계

근육 세포(C2C12 myoblasts 등)를 이용하여 피로개선 관련 기전 연구를 진행한다.

##### (2) 바이오마커

시험원료의 피로개선 작용 기전을 설명하기 위하여 예상되는 대사 경로에 위치하고 있는 유전자, 효소, 전사인자, 신호전달물질, 대사산물 등의 바이오마커에 대한 활성 및 그 발현 정도 등을 측정한다.

##### (3) 통계처리

시험결과는 시험물질 처리에 따른 변화 또는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 판정한다.

#### 나. 동물시험

##### (1) 시험계

신체적 및 정신적 스트레스를 유발한 실험동물을 사용한다.

##### (2) 바이오마커

실험동물을 대상으로 원료의 경구 투여 또는 섭취에 의한 피로개선 관련 바이오마커의 변화를 측정한다.

##### (3) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 판정한다.

## 다. 인체적용시험

### (1) 시험대상

#### ① 시험대상자(예시)

- 평소 피로감을 느끼는 만19세 이상 만65세 미만의 성인남녀
- 경증의 피로도를 가진 자  
(예 : VAS 28, FSS(Fatigue Severity Scale) 27점 이상)

#### ② 대상자 제외기준(예시)

##### ○ 질병상태

- 스크리닝 시 AST 또는 ALT 또는 serum bilirubin > UNL X 2배, 또는 약물성/알코올성 간염, 간경화증, 치료가 필요한 지방간 환자
- 스크리닝 시 serum creatinine > UNL X 2배, 또는 만성 신부전증 환자 또는 투석이 필요한 신장 질환자
- 스크리닝 시 조절되지 않는 고혈압(SBP > 180 mmHg 또는 DBP > 110 mmHg) 또는 부종 환자
- 스크리닝 시 조절되지 않는 당뇨병(HbA1c > 9%) 환자
- 과거 5년 이내 악성 종양 기왕력이 있는 자
- 결핵, 다발성경화증, 갑상선 기능 저하증, 약물로 조절되지 않는 천식이 있는 자
- 주요우울장애(major depressive disorder), 양극성 정서장애, 정신분열증, 치매, 망상 장애 환자
- 불면증이 있는 자
- 체질량지수(BMI)가 18.5 kg/m<sup>2</sup> 이하 또는 30 kg/m<sup>2</sup> 이상인 자

##### ○ 생리적 상태

- 트레드밀 또는 싸이클 에르고미터 등의 운동 수행이 불가능한 자
- 임신 또는 수유 중이거나 본 인체적용시험기간 동안 임신 계획이 있는 자

##### ○ 약물복용 등

- 스크리닝 전 1년 이내 알코올 및 기타 약물 남용 기왕력자
- 첫 방문 1개월 내에 건강기능식품 또는 운동수행능력이나 피로에 영향을 줄 수 있는 제품(헬스보충제, 피로회복제 등)을 지속적으로 섭취한 자

- 생활 습관
  - 야간근무자
  - 알코올섭취: 남자<30 g/일(맥주 3잔, 소주 3잔 정도), 여자<20 g/일(맥주 2잔, 소주 2잔 정도)
  - 과도한 흡연자(25 개비/일 이상)
  - 첫 방문 3개월 내에 고강도 이상의 운동을 지속적으로 한 자
  - 평소 단백질 섭취량이 과도한 자, 채식주의자
- 알레르기
  - 시험물질에 대한 알레르기/부작용이 있는 자
- 기타
  - 최근 3개월 내 다른 인체적용시험에 참여한 자
  - 그 외 연구자에 의해 실험에 부적합하다고 판단되는 자
  - 연구자에 의해 인체적용시험 참여에 부적합하다고 판단되는 자

## (2) 시험설계

이중눈가림, 무작위배정, 위약대조연구(Randomized, controlled trial; RCT)를 기본으로 한다. 시험설계 시 대상자 선정·제외 기준을 명확히 하여 기관생명윤리위원회(IRB)에서 약물 치료가 필요한 대상자가 시험에 포함되지 않도록 한다. 이때, 기관명과 승인일이 기술되도록 한다.

대상자 수의 산출방법과 근거, 검정력 등은 기술되어야 하며, 이중눈가림이 이루어진 경우, 배정된 군에 대해 비밀이 유지된 대상(예: 연구대상자, 연구담당자, 결과분석자 등), 비밀유지방법, 눈가림의 해제 등에 대해 기술하고 비뚤림 방법을 최소화하기 위한 방법(무작위배정)이 기술되어야 한다.

또한, 평가지표에 영향을 미칠 수 있는 기저시점에서의 각 군 대상자들의 인구학적 특성, 기초특성(성별, 연령, 신체 활동량, 흡연력, 약물 복용력, 식이 섭취량, 체중, 운동, 음주 등)을 군간 차이로 기술한다.

### (3) 바이오마커

기능성 내용을 확인할 수 있는 피로개선 관련 바이오마커의 변화를 측정한다. 바이오마커는 기전별로 다양한 지표들이 포함되어 있기 때문에 연구 목적에 부합하는 추측 기전을 선정하고, 관련된 바이오마커의 결과에 일관성이 나타나야 한다(III. 기능성 시험방법 1. (1). 연구유형별 바이오마커 참고).

### (4) 통계처리

인구학적 자료 및 기초특성의 측정지표에 대한 통계분석방법을 기술하고 분석군(ITT, FAS, PP)에 대해 명확하게 정의하여 주분석군 설정에 대한 설명이 계획서와 결과보고서에 기술되도록 한다. 또한, 기능성 평가지표에 대한 통계분석방법 및 중도탈락자 및 결측치처리에 대한 통계분석방법을 명확히 한다. 연구 개시 후 측정 시기 및 방법의 변화가 있는 경우, 그 변경 사유를 기술하여야 하며, 층화 분석, 보정분석 등이 제출된 경우, 사전 계획 여부가 기술되도록 한다. 이때, 각 군별 기능성 평가지표에 대한 분석결과에 사용된 통계분석방법, 군간 통계적 유의성, 시험대상자 수, 평균, 표준편차 등이 확인될 수 있도록 하여야 하며 통계분석방법의 변경이 있는 경우, 변경사항에 대해 기술하도록 한다.

### 1. 종속변수가 범주형일 경우

- 범주형 변수는 크게 명목 척도와 순위 척도로 구분할 수 있음
  - 명목 척도 : 성별, 국가, 흡연 여부 등 연속되지 않으며 범주 간 서열이 존재하지 않는 범주형 척도
  - 순위 척도 : 질병의 병기(1기, 2기, 3기) 등 연속되지 않으나 범주 간 서열이 존재하는 범주형 척도
- 연속형 변수는 수치화된 변수로 연속성이 있으며, 평균, 표준편차 등을 계산할 수 있는 변수임

#### 1.1. Chi-square test

- 두 군간의 차이를 비교할 때 사용됨
  - \* 빈도가 5 미만인 항목이 있는 경우 Fisher's exact test를 사용

#### 1.2. McNemar's test

- 군 내의 전후 차이를 비교할 때 사용됨

### 2. 종속변수가 연속형이고 비교군이 2개일 경우

※ 연구 내 비교군이 2개(대조군, 시험군)일 경우 사용되는 분석 모델임

#### 2.1. Paired T-test : 군 내의 전후 차이를 비교할 때 사용됨

##### 2.1.1. Wilcoxon's signed-ranks T-test

- 군 내의 전후 차이 비교 시, 변수의 분포가 정규분포를 따르지 않는 경우 사용됨

#### 2.2. Independent T-test : 두 군간의 차이를 비교할 때 사용됨

##### 2.2.1. Wilcoxon's signed-ranks T-test

- 두 군간의 차이 비교 시, 변수의 분포가 정규분포\*를 따르지 않는 경우 사용됨

#### 2.3. Linear mixed effect model

- 유효성 평가 지표 측정 시점이 3회 이상일 경우 사용할 수 있음\*

\* 방문 시점 간의 공분산 구조(covariance structure)를 결정하여 분석에 적용할 수 있는 모델이며, 효과의 크기(slope), linear function의 절편(intercept) 등의 방문시점, 대상자 등에 따른 고정효과(fixed effect) 또는 무작위효과(random effect)의 여부를 결정하여 model안에 혼합(mixed effect)하여 적용할 수 있음

### 3. 종속변수가 연속형일 경우 AND 비교군이 3개 이상일 경우

※ 연구 내 비교군이 3개(대조군, 시험군1, 시험군2 등)일 경우 사용되는 분석 모델임

3.1. ANOVA(Analysis of variance) : 군 간의 차이를 비교할 때 사용

3.2. Kruskal Wallis test : 군 간의 차이 비교 시, 변수의 분포가 정규분포를 따르지 않는 경우 사용

※ 변수 분포의 정규성 검정

- 정규성 검정 방법은 Kolmogorov-Smirnov test, Shapiro-Wilk test 등의 방법으로 검정할 수 있음. 일반적으로 p value가 0.05 미만일 경우, 정규분포를 따르지 않는 것으로 판단함. 그러나 현실에서 해당 기준에서 정규분포를 따르는 경우가 많지 않으므로, p value가 0.05 이상이라도 marginal한 p value를 확인하거나 Q-Q plot을 육안으로 확인하는 등 연구자가 자의적으로 정규분포를 따르는 것으로 판단할 수 있음
- 군 당 sample size가 30 이상인 경우, 중심극한정리를 이용하여 정규성을 가정하는 경우가 있음. 그러나 중심극한정리는 표본집단이 대표하는 모집단이 무한모집단이라는 가정 하에 사용됨. 즉, 모집단에 대한 가정이 불확실한 경우 또는 유한모집단인 경우가 있으므로 군 당 sample size가 30 이상이라고 해도 정규성 검정이 필요할 수 있음. 또한 30명이라는 기준은 연구자가 임의적으로 설정한 것임을 고려하여 절대적인 기준이 되지 않을 수 있음

4. 교란변수 보정이 필요한 경우

- Randomized Clinical Trial(중재연구)은 randomization을 통해 대상자가 군에 배정 되므로, 교란변수를 통제할 수 있는 설계의 연구임. 그러나 우연에 의해 baseline의 특성이 군 간 차이를 보이는 경우가 발생할 수 있음. 이럴 경우, 연구자는 해당 변수를 공변량(covariate)으로 model에 포함시켜 분석할 수 있음. 그러나 가능할 경우, randomization block으로 생성하여 randomization 단계에서 층화무작위배정 등으로 미리 불균형을 방지하는 것이 바람직할 수 있음

4.1. ANCOVA

- 보정하고자 하는 변수를 모델 내 공변량(covariate)으로 추가할 수 있음

4.2. Linear mixed effect model

- 보정하고자 하는 변수를 모델 내 공변량(covariate)으로 추가할 수 있음

## IV 참고문헌

1. 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」, 식품의약품안전청 고시 제2011-34호, 2011
2. 건강기능성식품 기능성 평가 가이드 (5), 식품의약품안전청, 2012
3. 건강기능식품의 피로회복 관련 기능성평가체계 구축, 식품의약품안전청, 2004
4. 고지현. 발효 돈태반의 피로 개선 효과에 관한 연구. 경희대학교 대학원, 2017
5. 김창선, 김지연, 김효진, 김지원, 민석기, 박동호. 유산소성 및 무산소성 최대운동 후 혈중 젖산 생성 및 제거율 비교. Korean Society of Exercise Physiology 26(4):239-247, 2017
6. 나주련, 김선오, 조아라, 배동혁, 오교녀, 김용재, 이유현, 전우진. 석류 열수 추출물의 수면박탈을 유도한 Rat 모델에서의 항스트레스 효과. 한국식품영양과학회지 45(11):1533-1543, 2016
7. 남동현. 만성피로증후군에 대한 보중익기탕과 그 변방의 효과 : 체계적인 문헌고찰. 대한한의학회지 41(1):93-106, 2020
8. 백일영, 꺾이섭 외. 운동 전 BCAA, OKG 및 Albumin 가중 투여가 에너지 생성 물질과 대사관련 호르몬 변화에 미치는 영향. 생명과학회지 16(6):890-897, 2006
9. 백일영, 장외룡 외. 매실 추출물 섭취가 에너지기질 및 피로물질 변화에 미치는 영향. 생명과학회지 20(1):59-54, 2010서지원, 최현선, 천정남, 송원섭. 매실 과피, 과육과 핵의 품종별 추출액의 항산화 활성. 한국자원식물학회 2019년도 추계학술대회 100, 2019
10. 송상욱. 만성 피로 증후군. 대한임상통증학회지 2(1):26-46, 2003
11. 송원섭. 中國 紅景天(Rhodiola saccharinensis)의 뿌리와 잎의 항산화 활성과 紅景天 요구르트의 특성. 한국자원식물학회 2018년도 춘계학술발표회 103, 2018
12. 심새근. 인삼추출물과 유기산 반응을 통한 진세노사이드 Rg5 함량 증대 연구. 건국대학교 산업대학원, 2015

13. 심정훈. 연산오세 유래 펩타이드를 활용한 한방음료가 흰쥐의 운동성 및 혈중지질, 항산화에 미치는 영향. 대전대학교 대학원, 2017
14. 여혜연, 이혜연, 이지연, 강상모. 식초 식이가 전신경락마사지로 인한 피로도 저감화에 미치는 영향. Kor. J. Aesthet. Cosmetol 12(2):177-189, 2014
15. 오준상. Metabolic profiling for the developmental stage of Cordyceps militaris and its anti-cancer and anti-fatigue activities. 중앙대학교 대학원, 2019
16. 윤성진, 김기형 외. 홍삼 섭취가 유·무산소성 운동수행능력과 중추 및 말초피로에 미치는 영향 J. Ginseng Res. Vol. 32, 210-219, 2008
17. 이동국. 만성 피로증후군. 2002 대한임상노인의학회 23-30, 2002
18. 이수정, 오수정, 강민정, 신정혜, 강신권. 전복 복합물의 항산화능 및 피로개선 효과. 한국식품저장유통학회지 22(4):598-606, 2015
19. 이정현, 정현석, 임수미, 조한별, 마지영, 고은, 임주연, 이선헌, 배수진, 이유진, 류인균, 정도연. 대학교 재학생에서 Fatigue Severity Scale의 신뢰도 및 타당도 연구. Korean J Biol Psychiatry 20:6-11, 2013
20. 이지홍. 크로스핏 운동 후 BCAA 섭취가 혈중피로변인, 혈압 및 심박수에 미치는 효과. 계명대학교스포츠산업대학원, 2016
21. 임은화. 산수유, 구기자 추출물 식이가 전신경락마사지의 피로감 개선에 미치는 영향. 건국대학교 대학원, 2016
22. 정승필, 이근미. 만성 피로증후군 Yeungnam Univ. J. of Med. Vol.24 No.1 p1-10, 2007
23. 정혁상, 김은영 외. 紅景天추출물(KH101)이 강제유영흰쥐의 피로회복에 미치는 영향 KoreanJ.Orient.Int.Med 29(4)922-93, 2008
24. 조지영, 김철환, 성은주, 신호철, 김승아, 강새미, 이승민. 피로환자에서 신체활동 관련 요인들. The Korean Academy of Family Medicine 8(5):669-675, 2018
25. 최선영. 노인에서의 만성 피로. Korean J Clin Geri 18(2):53-57, 2017

26. Bach HV, Kim J, Myung SK, Cho YA. Efficacy of Ginseng Supplements on Fatigue and Physical Performance: a Meta-analysis. *J Korean Med Sci* 31(12):1879-1886, 2016
27. Balachander S, Rao P, Sarkar SD, Singh SM. Chronic fatigue syndrome: A review. *Medical Journal of Dr. D.Y. Patil University* 7(4):415-422, 2014
28. Brown AE, Jones DE, Walker M, Newton JL. Abnormalities of AMPK activation and glucose uptake in cultured skeletal muscle cells from individuals with chronic fatigue syndrome. *PLoS One* 10(4):e0122982, 2015
29. Brutsaert TD, Hernandez-Cordero S, et al. Iron supplementation improves progressive fatigue resistance during dynamic knee extensor exercise in iron-depleted, nonanemic women *Am J Clin Nutr* 77(2):441-8, 2003
30. Campbell, Reece et al. *생명과학*, PEARSON, 2008
31. Carter S, Solomon TPJ. In vitro experimental models for examining the skeletal muscle cell biology of exercise: the possibilities, challenges and future developments. *European Journal of Physiology* 471:413-429, 2019
32. Choi JY, Woo TS, et al. Red ginseng supplementation more effectively alleviates psychological than physical fatigue. *J Ginseng Res* 35(3):331-8, 2011
33. Choi S, Disilvio B, Fernstrom MH, Fernstrom JD. Oral branched-chain amino acid supplements that reduce brain serotonin during exercise in rats also lower brain catecholamines. *Amino Acids* 45(5):1133-42, 2013
34. Coqueiro AY, Raizel R, Bonvini A, Hypólito T, Godois AAM, Pereira JRR, Garcia ABO, Lara RDSB, Rogero MM, Tirapegui J. Effects of Glutamine and Alanine Supplementation on Central Fatigue Markers in Rats Submitted to Resistance Training. *Nutrient*, 2018
35. Coqueiro AY, Rogero MM, Tirapegui J. Glutamine as an Anti-Fatigue Amino Acid in Sports Nutrition. *Nutrients* 11(4):863, 2019

36. Dennistion, Topping, Caret. 생화학, 녹문당, 2008
37. Dougherty JP, Springer DA, Gershengorn MC. The Treadmill Fatigue Test: A Simple, High-throughput Assay of Fatigue-like Behavior for the Mouse. *J Vis Exp* (111):54052, 2016
38. Falavigna G, Jr ADAJ, et al. Effects of diets supplemented with branched-chain amino acids on the performance and fatigue mechanisms of rats submitted to prolonged physical exercise. *Nutrients*. Nov 16;4(11):1767-80, 2012
39. Fischer DB, William AH, Strauss AC, Unger ER, Jason L, Jr GDM, Dimitrakoff JD. Chronic Fatigue Syndrome: The Current Status and Future Potentials of Emerging Biomarkers. *Fatigue* 2(2):93-109, 2014
40. Foley TE1, Fleshner M. Neuroplasticity of dopamine circuits after exercise: implications for central fatigue. *Neuromolecular Med* 10(2):67-80, 2008
41. Fox SI, 생리학, 라이프사이언스, 2004
42. Fukuda S, Nojima J, Motoki Y, Yamaguti K, Nakatomi Y, Okawa N, Fujiwara K, Watanabe Y, Kuratsune H. A potential biomarker for fatigue: Oxidative stress and anti-oxidative activity. *Biol Psychol* 118:88-93, 2016
43. Haß U, Herpich C, Norman K. Anti-Inflammatory Diets and Fatigue. *Nutrients*, 2019
44. Hsu Y, Huang W, Lin J, Chen Y, Ho S, Huang C, Tung Y. Kefir Supplementation Modifies Gut Microbiota Composition, Reduces Physical Fatigue, and Improves Exercise Performance in Mice. *Nutrients* 10(7):862, 2018
45. Imai A, Oda Y, Ito N, Seki S, Nakagawa K, Miyazawa T, Ueda F. Effects of Dietary Supplementation of Astaxanthin and Sesamin on Daily Fatigue: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Two-Way Crossover Study. *Nutrients* 10(3):281, 2018

46. Jin T, Rong P, Liang H, Zhang P, Zheng G, Lin Y. Clinical and Preclinical Systematic Review of Panax ginseng C. A. Mey and Its Compounds for Fatigue. *Front Pharmacol* 11:1031, 2020
47. Joung J, Lee J, Cho J, Lee D, Ahn Y, Son C. The Efficacy and Safety of Myelophil, an Ethanol Extract Mixture of Astragali Radix and Salviae Radix, for Chronic Fatigue Syndrome: A Randomized Clinical Trial. *Frontiers in Pharmacology*, 2019
48. Khong TK, Selvanayagam VS, Sidhu SK, Yusof A. Role of carbohydrate in central fatigue: a systematic review. *Scand J Med Sci Sports* 27(4):376-384, 2017
49. Klimas NG, Broderick G, Fletcher MA. BIOMARKERS for CHRONIC FATIGUE. *Brain Behav Immun* 26(8): 1202-1210, 2012
50. Lexell J, Jonasson SB, Brogardh C. Psychometric Properties of Three Fatigue Rating Scales in Individuals With Late Effects of Polio. *Ann Rehabil Med* 42(5):702-712, 2018
51. Mehrabani S, Askari G, Miraghajani M, Tavakoly R, Arab A. Effect of coenzyme Q10 supplementation on fatigue: A systematic review of interventional studies. *Complement Ther Med* 43:181-187, 2019
52. Michielsen HJ, Vries JD, Heck GLV. Psychometric qualities of a brief self-rated fatigue measure: The Fatigue Assessment Scale. *J Psychosom Res* 54(4):345-52, 2003
53. Mielgo-Ayuso J, Calleja-Gonzalez J, Coso JD, Urdampilleta A, León-Guereño P, Fernández-Lázaro D. Caffeine Supplementation and Physical Performance, Muscle Damage and Perception of Fatigue in Soccer Players: A Systematic Review. *Nutrients* 11(2):440, 2019
54. Nowak A, Boesch L, Andres E, Battegay E, Hornemann T, Schmid C, Bischoff-Ferrari HA, Suter PM, Kräyenbuehl P. Effect of vitamin D3 on self-perceived fatigue: A double-blind randomized placebo-controlled trial. *Medicine (Baltimore)* 95(52):e5353, 2016

55. Rimbaut S, Gutte CV, Brabander LV, Bossche LV. Chronic fatigue syndrome – an update. *Acta Clinica Belgica* 71(5):273-280, 2016
56. Sugino T, Shirai T, et al. L-Ornithine supplementation attenuates physical fatigue in healthy volunteers by modulating lipid and amino acid metabolism *Nutr Res* 28(11):738-43, 2008
57. Sunga W, Kangb H, Jungc C, Parkd S, Lee S, Kim E. Efficacy of Korean red ginseng (*Panax ginseng*) for middle-aged and moderate level of chronic fatigue patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Complementary Therapies in Medicine*, 2019
58. Turck D, Castenmiller J, Henauw SD, Hirsch-Ernst KI, Kearney J, Knutsen HK, Maciuk A, Mangelsdorf I, McArdle HJ, Naska A, Pelaez C, Pentieva K, Thies F, Tsabouri S, Vinceti M, Bresson J, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heinonen M, Neuhäuser-Berthold M, Nowicka G, Sanz Y, Sjödin A, Stern M, Tomé D, Loveren HV, Willatts P, Martin A, Strain JJ, Heng L, Martínez SV, Siani A. Guidance on the scientific requirements for health claims related to muscle function and physical performance: (Revision 1). *EFSA J* 16(10):e05434, 2018
59. Xu Y, Zhang P, Wang C, et al. Effect of ginsenoside Rg3 on tyrosine hydroxylase and related mechanisms in the forced swimming-induced fatigue rats. *J Ethnopharmacol* 28:150(1):138-47, 2013

## 건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서)

- 피로개선 관련 -

---

발 행 인 : 서경원

편 집 위 원 장 : 윤혜정

편 집 위 원 : 이혜영, 윤태형, 권광일, 서은채, 이유경, 고경욱, 정유경,  
홍은경, 김규현, 이미영, 안정선, 최정호, 이세윤, 이민아

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2022년 7월

문 의 처 : 식품위해평가부 영양기능연구과  
(043-719-4402, 4409, 4416, 4417, 4419, 4422,  
4428, 4429)

---



# 건강기능식품 기능성 평가 가이드 (민원인 안내서)

MINISTRY OF FOOD AND DRUG SAFETY  
[www.mfds.go.kr](http://www.mfds.go.kr)



**【공직자 부조리 및 공익신고안내】 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.**

- ▶ 부조리 신고 : 식약처 홈페이지 “국민신문고 > 공직자 부조리 신고” 코너
- ▶ 공익 신고 : 식약처 홈페이지 “국민소통 > 신고센터 > 부패·공익신고 상담” 코너