

발간등록번호
안내서-0831-01

청렴[·]한[·]세상

건강기능식품 기능성 평가 가이드[민원인 안내서]

- ‘칼슘흡수 촉진에 도움을 줄 수 있음’ 편 -

2017. 12.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

건강기능식품 기능성 평가 가이드_칼슘흡수 촉진에 도움

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	☐ 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.	
지침서·안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(☞지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(☞안내서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	

상기 사항에 대하여 확인하였음.

2017 년 12 월 28 일

담당자
확 인(부서장)

서 은 채
오 금 순

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 2017년 12월 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(식품의약품안전처 지침서 등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품 안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구팀으로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4428

팩스번호: 043-719-4420

제 · 개정 이력

연번	제개정번호	승인일자	주요내용
1	안내서-0831-01	2017.12.28.	제정

* 약어	1
I. 서론	3
II. 일반적 사항	3
1. 개요	3
2. 보건학적 중요성	16
III. 기능성 시험방법	18
1. 바이오마커의 선정	18
2. 주요 바이오마커의 측정 방법	21
3. 시험 설계 시 고려 사항	26
V.참고문헌	29

약어

AAS	Atomic absorption spectrophotometer
ADP	Adenosine diphosphate
ATP	Adenosine triphosphate
ATPase	Adenosine triphosphatase
CaBP	Calcium binding protein carrier
Caco-2	Human colon adenocarcinoma cell line
CB	Calbidin
Cldn	Claudin
DPD	Urinary deoxypyridinoline
ECF	Extracellular fluid
GC	Glucocorticoids
GH	Growth hormone
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometer
IGF1	Insulin-like growth factor 1
NCX1	Intestinal $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger
OCPC	O-Cresolphthalein Complexone
OSC	Serum osteocalcin
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase C
PKC	Protein kinase C
PMCA1	Calcium ATPase type 1
PMCA1b	Plasma membrane Ca^{2+} -ATPase1b
PRL	Prolactin
PTH	Parathyroid hormone
ROCK	RhoA-associated coil-forming kinase

RT-PCR	Real-time reverse transcription polymerase chain reaction
TH	Thyroid hormone
TRPV6	Transient receptor potential vanilloid type 6
1,25(OH) ₂ D	1,25-dihydroxyvitamin D

I

서론

이 평가 가이드[민원인 안내서]는 건강기능식품 기능성원료를 개발하는 연구자 및 영업자에게 기능성(칼슘흡수 촉진에 도움)에 대한 바이오마커 등의 정보를 제공함으로써 산업체의 기능성원료 연구개발에 적정을 기하고 효율성을 높이하고자 작성되었다.

II

일반적 사항

1. 개요

가. 칼슘의 분포

칼슘은 탄소, 수소, 산소, 질소 등으로 만들어진 유기화합물에 이어 체내에 5번째로 많이 함유되어 있는 영양소이며, 인체 내의 무기질 중 가장 많은 양으로 존재한다. 사람에 따라 다르지만 체중의 1.5~2% 정도가 칼슘으로 이루어져 있다(그림 1).

나. 칼슘의 흡수와 대사

칼슘의 흡수는 식사에 포함된 다른 영양소들과 칼슘농도를 조절하는 호르몬에 따라 달라지며, 개개인의 영양 상태나 연령 등에 따라서도 차이가 있다.

칼슘은 산성상태에서 흡수가 용이하므로 산도가 높은 십이지장과

공장에서 흡수가 잘 일어나며, 능동적 수송과 확산에 의해 흡수된다. 능동 수송은 십이지장에서 합성된 칼슘결합단백운반체(calcium binding protein carrier, CaBP)에 의해 칼슘이 혈류로 운반되는 것이다. 이 운반체는 비타민 D에 의해 조절되므로 비타민 D의 섭취가 부족하면 소장 내 칼슘의 흡수는 감소하게 된다. 확산은 칼슘의 농도가 낮은 혈액으로 이동하는 것을 말한다.

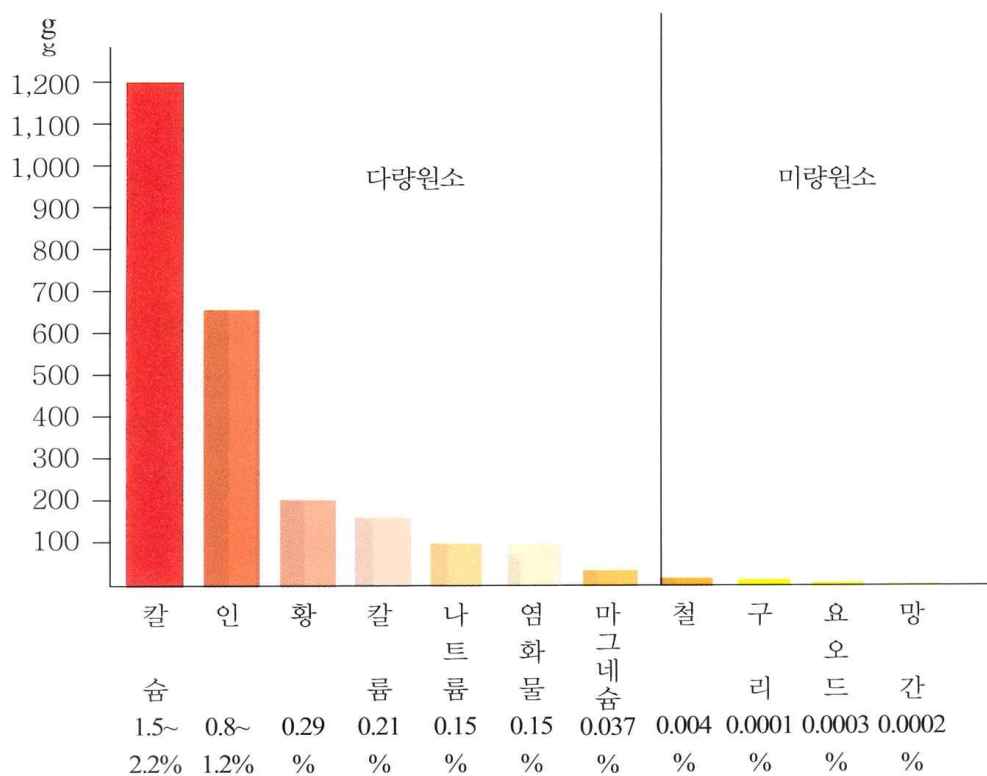


그림 1. 체중 60 kg 인 사람에 함유된 무기질의 양
[출처: 임상영양사를 위한 고급 영양학, 지구문화사, 2011]

또한 개개인의 영양 상태나 연령, 임신, 수유상태에 따라서도 달라진다. 보통 성인은 섭취량의 20~40%, 성장기 어린이는 75%, 임신기에는 60% 정도이고 노년기는 장년기에 비해 흡수율이 떨어지며,

특히 폐경기 여성에선 흡수율이 떨어져 20% 정도에 불과하다. 그 이유는 비타민D의 활성화와 효력을 증가시켜 주는 호르몬인 에스트로겐의 분비가 감소되기 때문이다. 그리고 인과 마그네슘의 과잉섭취는 칼슘흡수를 방해한다.

칼슘은 소변, 대변 및 땀을 통해 배설되고, 임산부는 태아에게 약 30 g 정도의 칼슘을 공급해 주며, 수유부는 모유 분비에 1일 약 250 mg의 칼슘을 소비한다. 대변으로 배설되는 칼슘은 내인성 칼슘(endogenous Ca)을 포함하여 흡수되지 않은 칼슘으로 구성되어 있다. 식이칼슘의 약 70~80%는 흡수되지 않고 대변으로 배설되며, 내인성 칼슘은 담즙과 췌장액과 같은 소화액으로 분비되었다가 재흡수 되지 못한 칼슘을 의미하는데, 그 양은 1일 100~150 mg 정도이다(그림 2).

최근 한 연구에 의하면 인의 과잉섭취는 뼈의 재흡수를 증가시키고 대변을 통한 칼슘의 배설을 촉진시킨다고 한다. 소변 중 칼슘의 배설은 개인에 따라 다소 차이가 있으나 1일 100~200 mg 정도이다.

단백질의 섭취가 많으면 소변으로 배설되는 칼슘은 증가하고, 인의 섭취량이 증가하면 소변 중의 칼슘 배설은 증가한다. 땀을 통해 배설되는 칼슘은 환경조건에 따라 다르지만 1일 20 mg 정도이다. 그러나 매우 뜨거운 환경에서 일하는 사람은 시간당 100 mg 정도의 칼슘이 땀을 통하여 배설할 수도 있다.

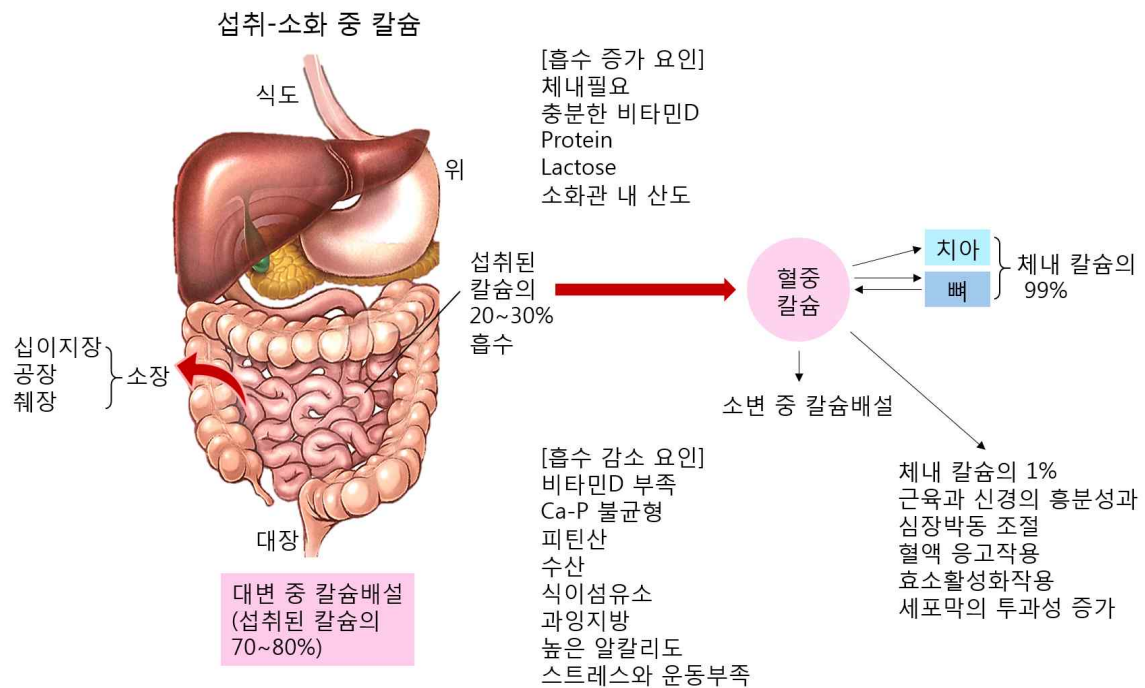


그림 2. 칼슘의 대사

[출처: 임상영양사를 위한 고급 영양학, 지구문화사, 2011]

다. 칼슘의 항상성(homeostasis)

혈중 칼슘은 체내의 정상적인 대사가 일어날 수 있도록 항상 일정한 농도(9~11 mg/dL)를 유지하고 있는데, 이것을 칼슘의 항상성이라고 한다(그림 3).

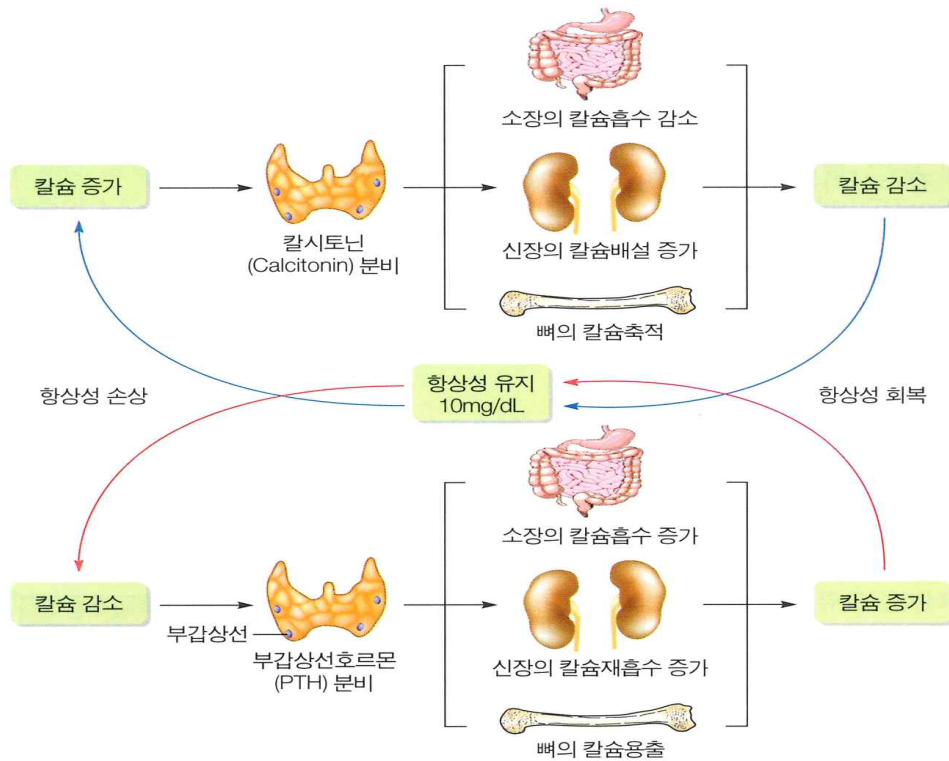


그림 3. 칼슘의 항상성
[출처: 기초 영양학, 수학사, 2008]

칼슘의 항상성은 칼시토닌(calcitonin)과 부갑상선호르몬(parathyroid hormone) 및 비타민 D에 의해 조절된다(그림 4 및 그림 5).

1) 칼시토닌(calcitonin)

칼시토닌은 갑상선에서 분비되며, 부갑상선호르몬과 비타민 D와는 반대기능을 하므로 혈중 칼슘농도가 정상 이상으로 높아졌을 경우에 자극받는다. 칼시토닌은 뼈 속의 칼슘 방출을 막고, 신장에서 소변을 통해 칼슘의 배설을 증가시킴으로써 혈중 칼슘농도를 저하 시킨다.

2) 부갑상선호르몬(parathyroid hormone)

부갑상선호르몬은 부갑상선에서 분비되고 혈중 칼슘을 조절하는 가장 중요한 호르몬으로서 주로 신장으로 배설되는 칼슘의 양을 조절한다. 혈중 칼슘농도가 정상 이하로 낮아지면 신장에서 칼슘의 재흡수를 증가시키고 칼슘의 배설을 감소시킨다. 또한 신장에서 비타민 D로부터 소장의 칼슘흡수율을 증가시키는 활성형 1,25-(OH)₂-비타민 D로의 전환을 촉진시켜 칼슘의 혈중농도를 증가시킨다.

3) 비타민 D

피부의 7-dehydrocholesterol로부터 자외선에 의해 형성되거나 식이로부터 흡수된 비타민 D₃는 간에서 저장형인 25-(OH) 비타민 D₃로 전환된다. 신장에서 25-(OH) 비타민 D₃는 부갑상선호르몬의 도움을 받아 다시 1,25-(OH)₂ 비타민 D₃로 전환된다. 1,25-(OH)₂ 비타민 D₃는 소장에서 칼슘의 흡수를 증진시키고, 부갑상선호르몬과 함께 신장에서 칼슘의 재흡수를 증진키시며, 뼈의 칼슘이 혈액 내로 잘 유입하도록 조절함으로써 혈중칼슘의 농도를 증가시킨다.

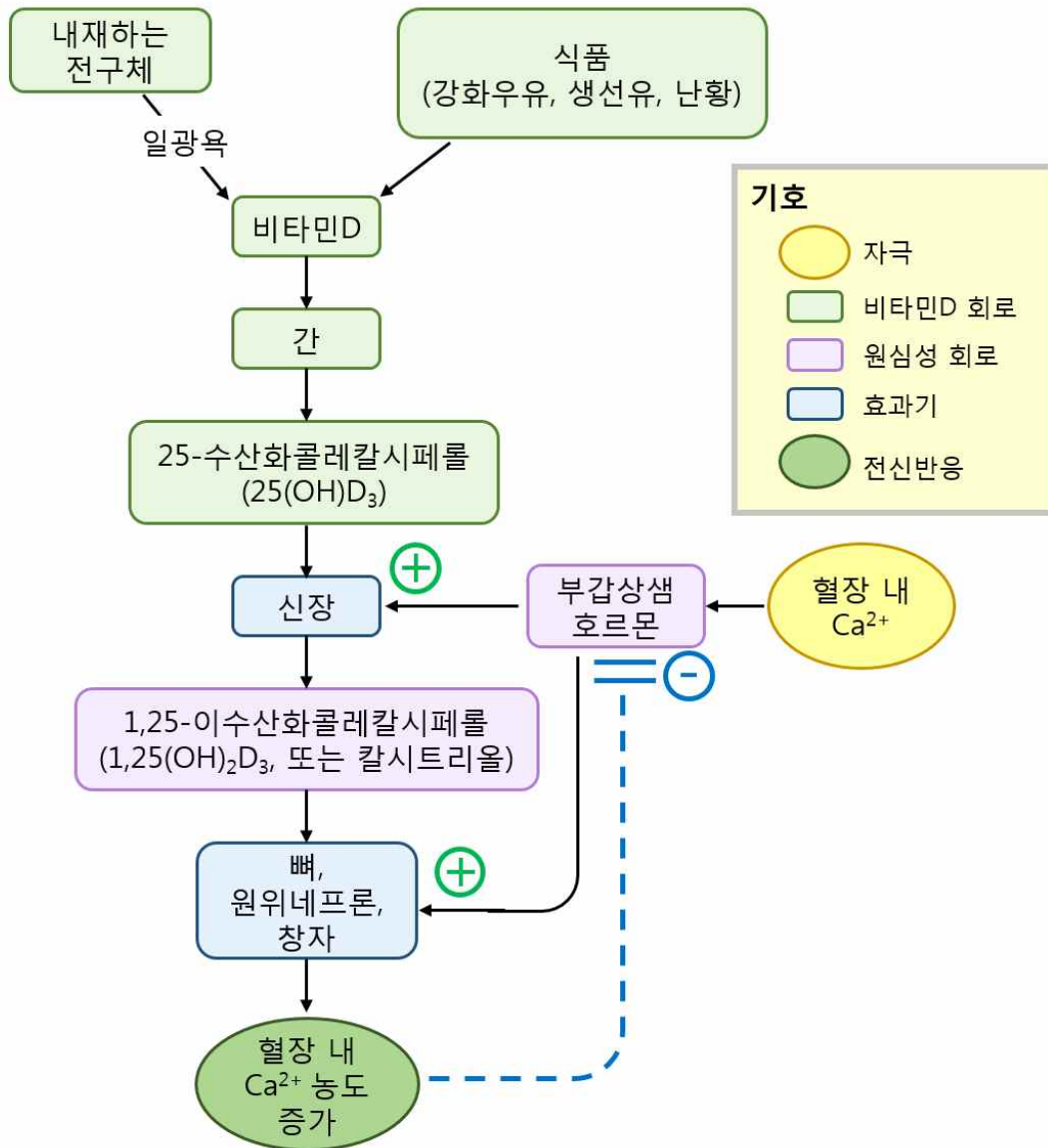


그림 4. 칼슘 균형의 내분비 조절
[출처: 생리학 4판, 라이프사이언스, 2009]

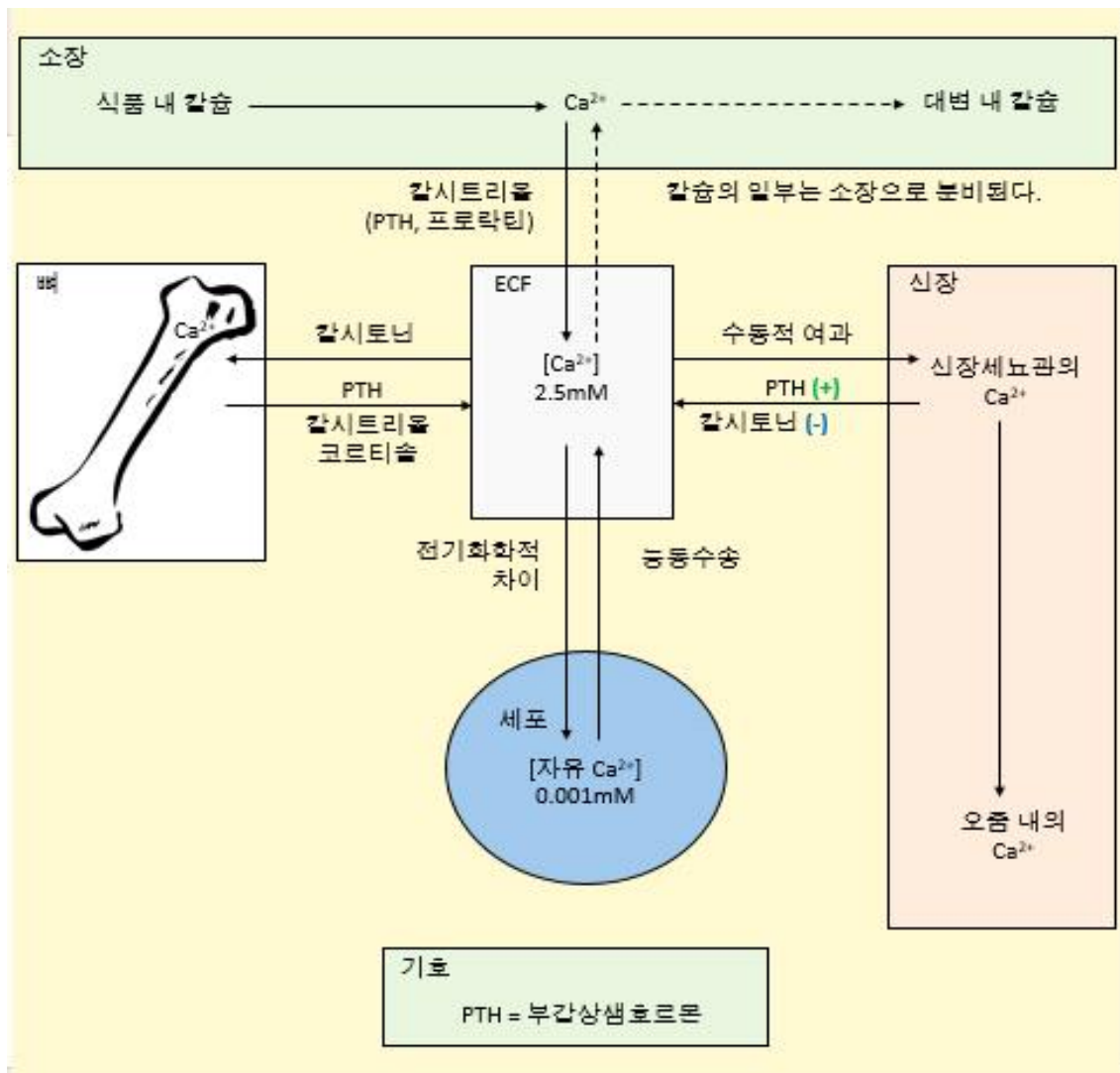


그림 5. 몸속의 칼슘 균형
[출처: 생리학 4판, 라이프사이언스, 2009]

칼슘은 많은 생체 기능에 반드시 필요하므로, 몸의 혈장 내 칼슘 이온 농도는 매우 엄격하게 조절된다. 칼슘 항상성은 무게 균형의 원칙을 따른다(표 1).

$$\text{전체 체중 칼슘} = \text{섭취량} - \text{방출량}$$

전체 체중 칼슘 이온(total body Ca^{2+})은 몸속의 전체 칼슘으로 세 부분으로 나뉘어 분포한다.

1) 세포외액(extracellular fluid, ECF) / 혈장(plasma)

칼슘 이온은 2.5 mM 정도로 ECF에 축적되어 있다. 혈장에서, 거의 절반 정도의 칼슘 이온은 혈장단백질이나 다른 분자에 결합하여 운반된다. 결합하지 않은 칼슘 이온은 자유 형태로 열린 칼슘 이온 채널을 통해 세포막을 지나 확산된다.

2) 세포 내 칼슘 이온

세포질의 자유 형태의 칼슘 이온 농도는 약 0.001 mM이다. 칼슘 이온은 미토콘드리아나 근육세포질세망에 몰려 있다. 칼슘 이온 채널이 열리면 전기화학적인 차이로 인해 칼슘 이온은 세포질 안으로 움직인다.

3) 세포외기질(뼈)

대부분이 수산화 인회석 결정으로 존재하는 뼈는 몸속 칼슘 이온의 가장 큰 저장소이다. 뼈의 칼슘 이온은 혈장 칼슘 이온의 항상성을 유지하기 위하여 방출될 수 있는 축적원이다. 일반적으로 뼈 칼슘 이온의 소량이 이온화되어 쉽게 교환되는데, 이것은 세포간질액의 칼슘 이온과 평형을 이루고 있다.

섭취(intake)는 식품으로부터 소화되어 소장에서 흡수된 칼슘 이온이다. 소화된 칼슘 이온의 1/3만이 흡수된다. 유기물질과 달리 칼슘 이온 흡수는 호르몬에 의해 조절된다.

방출량(output) 또는 칼슘 이온 손실은 주로 신장에서 일어나고, 대변으로 소량이 분비된다. 칼슘 이온은 사구체에서 자유롭게 여과된다. 칼슘 이온은 신장 단위를 통해 재흡수 되는데 호르몬 조절에 의한 재흡수는 원위세뇨관에서만 일어난다. 그 부분의 소관(tubule)에서 재흡수

되는 정단(apical)의 칼슘 이온 채널과 기저측(basolateral)의 $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ 역수송체와 Ca^{2+} -ATP 분해 효소 수송체에 의해 이루어진다.

표 1. 몸의 칼슘의 기능

구분	체내 칼슘의 비율	기능
세포외부	99%	뼈의 석화된 기질
세포외액	0.1%	치밀이음부를 위한 ‘접착제’, 심근과 민무늬근의 수축, 시냅스에서의 신경전달제 방출, 신경세포의 흥분, 혈액응고 연쇄반응 보조인자
세포내부	0.9%	2차 전령계의 신호, 근육 수축

[출처: 생리학 4판, 라이프사이언스, 2009]

라. 칼슘의 생리적 기능

1) 뼈와 치아의 형성

칼슘의 99%는 뼈와 치아를 형성하는 데 쓰인다. 뼈는 유기물질과 무기물질이 1:2 비율로 구성되어 있으며, 뼈 조직은 뼈 기질(matrix)과 뼈세포로 구성되었다. 뼈 기질은 콜라겐(collagen)이나 뮤코 다당체(mucopolysaccharide) 등으로 구성되며, 뼈가 형성될 때 스펀지 형태로 망구조를 형성한다.

뼈세포에는 골세포, 골아 세포, 파골세포의 3종류가 있다. 골아 세포는 망구조 사이사이에 무기질을 침착시켜 뼈를 형성하는 뼈 생성세포이며, 파골세포는 뼈를 용해시키고 분해시키는 뼈 용해세포이다. 뼈에는 칼슘이 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})$ 의 분자식을 갖는 수산화 인회석(hydroxyapatite) 형태로 존재한다. 뼈는 계속적으로 뼈 조직을 생성하고 분해하며 보수하고 재생시키는, 대사적으로 활성적인 조직으로 동적 평형상태(dynamic

equilibrium state)를 유지하고 있다.

잇몸에 있는 치아형성기관인 에나멜 모세포(ameloblasts)는 치아를 형성하기 위해 칼슘과 다른 구성원들을 저장한다. 치아조직은 뼈 조직에 비해 더욱 조밀하고 수분함량이 많으며, 무기질의 교체가 뼈 조직처럼 계속된다.

2) 체내의 대사과정 조절작용

체내 칼슘의 남은 1%는 중요한 대사적 기능을 수행한다.

가) 혈액응고작용

칼슘 이온은 혈액응고를 위하여 필수적으로 필요한 요소이다. 특히 프로트롬빈(prothrombin)을 트롬빈(thrombin)으로 전환시키는 과정에서 촉매제로 작용한다. 트롬빈은 용해성 단백질인 피브리노겐(fibrinogen)에 작용하여 불용해성이며 혈액을 응고시키는 피브린(fibrin)으로 전환시킨다(그림 6).

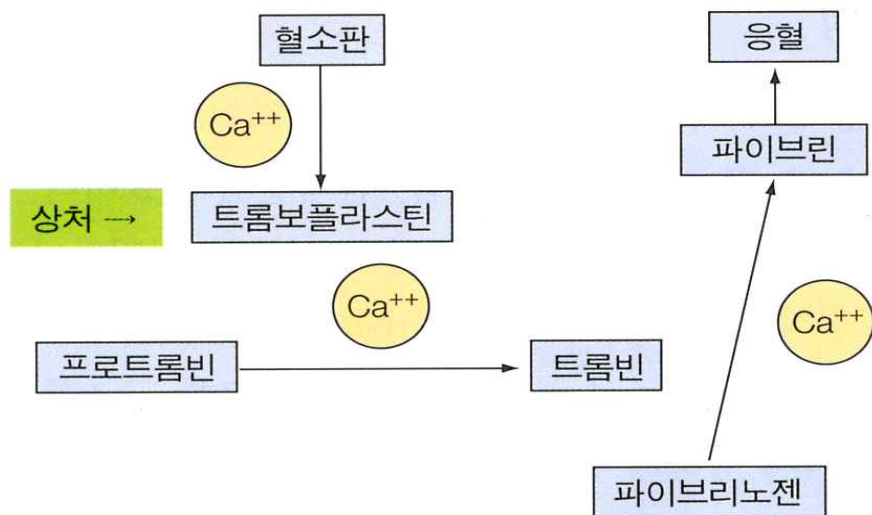


그림 6. 혈액 응고과정

[출처: 기초 영양학, 수학사, 2008]

나) 근육수축과 이완작용

각각의 근육에는 근육단백질인 액틴(actin)과 미오신(myosin)으로 구성된 근원섬유 몇 백 개가 포함되어 있다. 근육이 수축할 때 근장 내 그물에 붙어있던 칼슘은 방출되어 이온화되고 ATP를 방출시킴으로써 액틴과 미오신 사이에서 화학적 반응을 촉진하여 수축작용을 초래한 후 즉시 근장 내 그물에 다시 부착되어 이완작용을 일으킨다. 특히 칼슘은 심장 근육의 수축과 이완작용에 필수적이며, 마그네슘과 칼륨도 이 반응에 관여한다(그림 7).

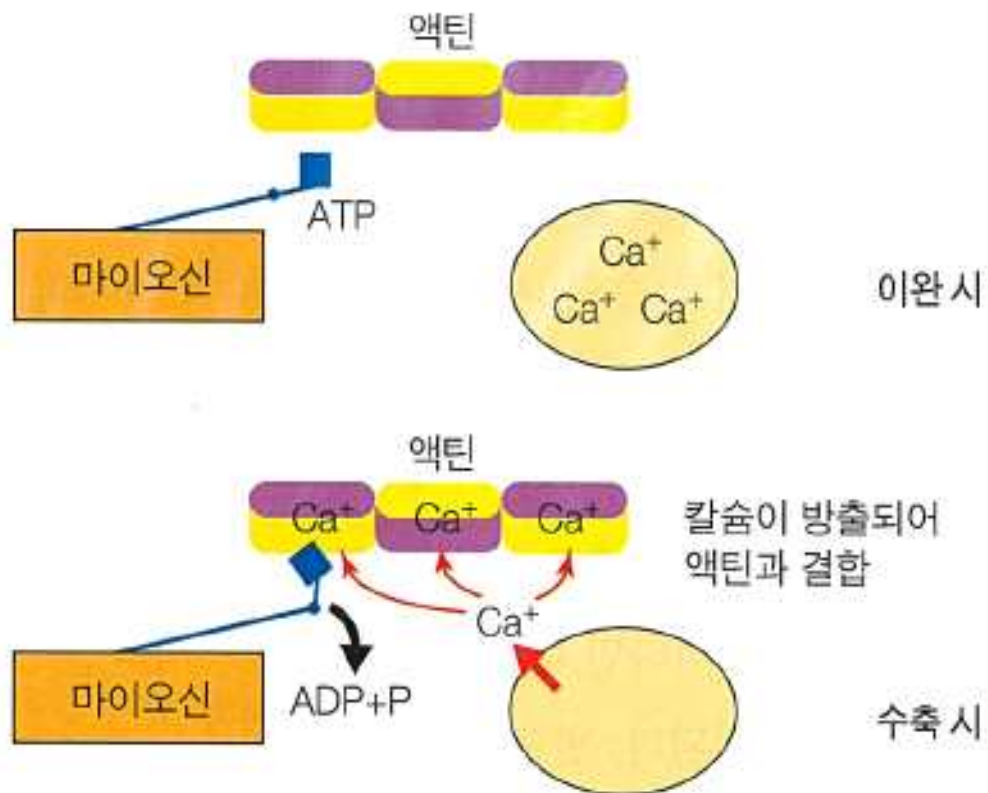


그림 7. 근육의 수축과 이완작용
[출처: 기초 영양학, 수학사, 2008]

다) 신경의 자극 전달작용

칼슘은 신경자극의 정상적인 전달을 위해 필요하다. 칼슘이온은 신경자극 전달물질인 아세틸콜린의 분비를 촉진시키고 근육섬유소를 흥분시킨다.

라) 세포막의 투과성 조절작용

이온화된 칼슘은 세포벽의 투과성에 영향을 주어 세포막을 통해 액체의 통과를 조절한다.

마) 효소반응에 대한 촉진작용

칼슘이온은 근육수축을 위한 에너지 방출에 있어서 Adenosine triphosphatase(ATPase)와 같은 특정한 효소들의 반응을 촉진시키며, 칼모듈린(calmodulin)과 결합하여 여러 세포대사 조절에 관여한다. 칼모듈린-칼슘 복합체는 효소의 활성을 변화시켜 글리코젠을 glucose-1-인산으로 분해시키는 데 관여한다.

2. 보건학적 중요성

어린 시절의 칼슘 섭취는 성인의 골 질량을 결정짓는 중요한 요소이며, 노화와 관련된 골 손실의 비율에도 영향을 준다. 적당한 칼슘 섭취는 골다공증을 예방하고, 높은 골 질량을 갖기 위해 권장된다.

골다공증은 전 세계적으로 수백만 명의 사람들에게 영향을 미치는 질환으로, 시간이 지남에 따라 뼈가 부서지기 쉽다는 것이 특징이다. 특히 50대 이상 남성과 여성의 골다공증 유병률이 남성은 7%인 반면에 여성은 40%로 약 6배 높게 나타났다. 또한 칼슘 섭취 부족은 대장암, 순환기계 질환, 우울증 및 고혈압의 위험이 높으며 소아의 정상 성장에 영향을 미칠 수 있다.

그러나 일반적으로 칼슘은 체내 이용률이 높지 않은 영양소로서, 흡수율이 최대 60%를 넘지 않으며 보통 성인의 경우 25~30%로 평가되고 있다. 장에서의 칼슘 흡수는 많은 요소에 의해 영향을 받기 때문에 칼슘 흡수 효율, 칼슘 섭취 적정량을 고려하여야 한다.

따라서 칼슘의 체내 이용률을 높이기 위한 여러 가지 방안이 강구되고 있는데 그중 칼슘 흡수에 도움을 주는 건강기능식품을 통해서 효과를 얻을 수 있다.

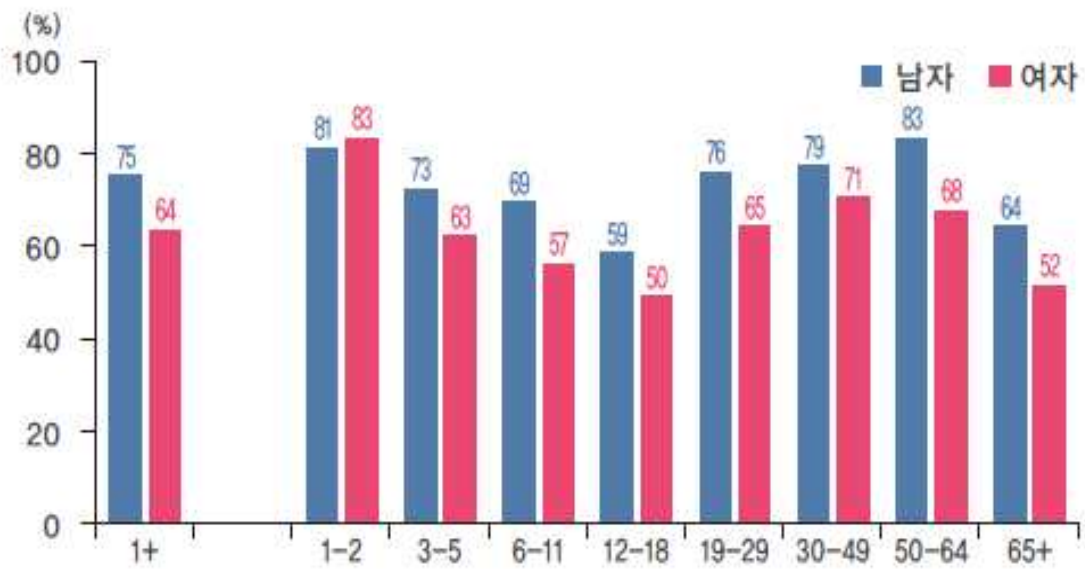


그림 8. 칼슘의 권장섭취량 대비 섭취비율

[출처: 국민건강영양조사, 2015]

Ⅲ

기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

칼슘 흡수에 도움 기능성을 확인하기 위한 시험관시험, 동물시험 및 인체적용시험의 바이오마커는 아래의 표를 참고할 수 있다.

구분	바이오마커	측정 가능한 연구 유형		
		시험관	동물	인체
칼슘 대사	장내 칼슘 흡수율		O	O
	혈청 칼슘 농도		O	O
	분, 뇨 중 칼슘 함량		O	O
	칼슘 용해성	O	O	
호르몬 분비	1,25-(OH) ₂ -비타민 D		O	O
	Parathyroid hormone (PTH)		O	O
유전자 발현	Transient receptor potential vanilloid type 6 (TRPV6)	O	O	
	Calbindin-D9k	O	O	
	Plasma membrane calcium-ATPase 1b (PMCA1b)	O	O	

가. 주요 평가지표

1) 칼슘 대사

칼슘은 우리 몸의 항상성을 유지하는데 필수적인 요소이다. 하지만 칼슘은 흡수율 및 체내 이용률이 높지 않은 영양소이며, 칼슘의 체내 흡수는 함께 섭취되는 여러 가지 식이성분, 장내 환경, 신체의 요구량에 따라서도 달라진다. 따라서 칼슘은 섭취된 양보다는 흡수율을 높이는 것이 더 중요하다.

가) 장내 칼슘 흡수율

섭취된 칼슘은 소장 점막을 통해 흡수된 후 각각의 장기로 이동되어 체내에서 이용되거나 골격으로 저장된다.

나) 혈청 칼슘 농도

칼슘 투여 후 혈청 칼슘 농도를 측정하여 칼슘 흡수율을 확인한다.

다) 분뇨 중 칼슘 함량

분을 채취하여 흡수되지 못하고 배설된 칼슘의 양을 측정하여 칼슘 흡수율을 확인한다. 뇨와 분으로 배설된 칼슘의 양을 측정하여 체내에 칼슘이 보유되는 정도를 확인한다.

라) 칼슘 용해성

칼슘의 생체이용률은 위장관 내에서의 용해성과 연관된다. 칼슘은 장내 용해성이 낮은 물질이기 때문에 장내에서의 칼슘 흡수율이 낮다. 칼슘의 용해성 증가를 측정하여 칼슘 흡수율 향상을 확인한다.

2) 호르몬 분비

가) 1,25-(OH)₂-비타민 D

혈중에 이온화된 칼슘의 농도를 조절하는 호르몬 중의 하나이자 장에서의 칼슘 흡수의 주요 조절자인 1,25-(OH)₂-비타민 D에 의해 혈청 농도 감소에 대한 반응으로 장의 칼슘 결합 단백질 양의 변화가 조절된다[15].

나) Parathyroid hormone(PTH)

혈중에 이온화된 칼슘의 농도가 낮아지면 PTH 분비가 증가하게 되고, 뼈에 작용하여 칼슘을 유리시키고 신장에서 칼슘을 재흡수 하여 소변으로 배출되는 칼슘의 양을 낮춘다.

3) 유전자 발현

가) Transient receptor potential vanilloid type 6(TRPV6)

TRPV6은 소장 점막 상피 세포의 luminal side에 위치하고, 칼슘 흡수를 촉진한다.

나) Calbindin-D9k

Calbindin-D9k은 세포 내에서 칼슘을 운반하거나 칼슘과 결합한다.

다) Plasma membrane calcium-ATPase 1b(PMCA1b)

PMCA1b은 소장 점막 상피 세포의 basolateral side에 위치하고, 세포에서 혈액으로 칼슘을 이동을 가능하게 한다.

2. 주요 바이오마커의 측정방법

가. 칼슘 대사

1) 장내 칼슘 흡수율

칼슘 안정성 동위원소를 이용한 tracer methods를 이용하여 칼슘 흡수율을 구한다. 단, 칼슘 흡수율 계산 시 사용한 동위 원소의 enrichment를 보정해야 한다.

☞ 계산식

Intestinal calcium absorption (%)

= [(Administered isotope amount - amount of unabsorbed isotopes corrected for fecal marker excretion) × 100]/administered isotope amount

The amount of unabsorbed isotopes corrected for fecal marker excretion
= (Amount of unabsorbed isotopes × number of excreted pellets)/number of ingested pellets

The amount of unabsorbed isotopes

= (Total calcium in feces × isotope enrichment × natural abundance of ^{44}Ca)
/[1+(isotope enrichment × natural abundance of ^{44}Ca)]

칼슘 안정성 동위원소의 종류는 ^{40}Ca , ^{42}Ca , ^{43}Ca , ^{44}Ca , ^{46}Ca , ^{48}Ca 등이 있다.

표 2. 칼슘 안정성 동위원소 종류 및 구분

Calcium Isotopes				
Stable Calcium Isotopes - Ca Isotopes				
Nominal mass	Accurate mass	% Natural abundance	Chemical form	Enrichment available %
⁴⁰ Ca			Fluoride, carbonate	99+
⁴² Ca	41.9586176 (13)	0.647 (23)	Oxide, carbonate	68 - 97+
⁴³ Ca	42.9587662 (13)	135 (10)	carbonate	56 - 90+
⁴⁴ Ca	43.9554806 (14)	2.086 (110)	carbonate, Oxide	94 - 98+
⁴⁶ Ca	45.953689 (4)	0.004 (3)	carbonate	5 - 24+
⁴⁸ Ca	47.952533 (4)	0.187 (21)	carbonate	75 - 97+

Calcium Isotopes (mainly Ca-42, Ca-44, Ca-46 and Ca-48) are used extensively in clinical research and mainly in nutritional studies. They are used to measure calcium absorption mainly in women and children. In adults, calcium deficiency is strongly related to increasing severity of osteoporosis. In children, calcium deficiency is primarily related to the development of rickets. Ca-48 has been used to bombard Pb and Bi targets in order to create super heavy elements.

[출처: Trace Sciences International, <http://www.tracesciences.com>]

2) 혈청 칼슘 농도

혈청 중의 칼슘 농도를 측정하기 위해 혈액을 채취하여 4℃에서 보관하였다가 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한다. 분리된 혈청은 분석 전까지 -70℃에서 보관한다.

Bhandarkar 등의 연구 결과에 따르면 칼슘 안정성 동위원소를 이용하여 칼슘의 흡수율을 측정해 본 결과 투여 2시간 후 혈액 중에서 측정하는 것이 흡수율을 측정하는데 가장 유효하다고 보고된 바 있다.

분석은 혈액 자동분석기, 혈액 생화학 분석기를 이용하여 Ca 항목을 측정하거나 calcium colorimetric assay kit를 이용하여 o-cresolphthalein complexone(OCPC) method에 의해 측정한다.

3) 분뇨 중 칼슘 함량

분은 일정한 무게가 될 때까지 건조시켜 마른 무게를 잰 후, 시료를 600℃에서 회화시켜 얻은 회분을 6N HCl 용액으로 용해한다. 뇨는 부피를 측정하고 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 시킨다.

분과 뇨는 원자흡광계(Atomic absorption spectrophotometer, AAS)를 이용하여 422.7 nm에서 이용하여 측정한다. 원자흡광계(AAS) 외에 과망가니즈산칼륨 적정법을 이용하여 칼슘 함량을 측정할 수 있다. 칼슘을 함유하는 용액에 수산염을 반응시켜 물에 난용인 수산칼슘($\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)으로 침전시킨다. 이후, 침전물을 약한 황산용액에 녹이고, 용액 내 수산을 KMnO_4 용액으로 적정하여 정량한다.

다음 계산식을 이용하여 칼슘 흡수량과 체내 칼슘 보유량을 확인한다.

☞ 계산식

칼슘 흡수량(mg) = 섭취량-분 중 배설량

칼슘 흡수율(%) = (칼슘 흡수량/섭취량) × 100

칼슘 보유량(mg) = 섭취량-(분 중 배설량+뇨 중 배설량)

칼슘 보유율(%) = (칼슘 보유량/섭취량) × 100

4) 칼슘 용해성

가) *In vitro*

불용성 칼슘 복합체인 인산염의 형태($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)로 축적되는 것을 억제할수록 높은 칼슘 농도를 나타내는 원리를 이용하여 칼슘 용해성을 측정한다.

칼슘 용해성을 측정할 시료 용액 0.5 mL 과 10 mM 염화칼슘 용액 0.5 mL을 섞고, 20 mM 인산 완충액(pH 8) 1.0 mL을 가한 후, 37℃에서 2시간

동안 incubation한다. 이 혼합액을 $2,000 \times g$, 25°C 조건으로 30분간 원심분리 한다. 원심분리 된 상층액과 용액 전체의 칼슘 농도를 calcium colorimetric assay kit를 이용하여 o-cresolphthalein complexone(OCPC) method에 의해 측정한다.

칼슘 용해성(%)은 다음 식을 이용하여 계산한다.

☞ 계산식

$$\text{칼슘 용해성(\%)} = (\text{상층액의 칼슘 농도} / \text{용액 전체의 총 칼슘 농도}) \times 100$$

나) *In vivo*

소장을 상하부로 분리하고 소장내용물을 차가운 생리식염수를 이용하여 완전히 씻어 내린 후, 적당한 부피로 맞추어 균질화 한다. 이후 $8,000 \times g$, 4°C 조건으로 20분간 원심분리 한다. 상층액(가용성)과 침전물(불용성)을 분리하여 -20°C 에서 분석 시까지 보관한다. 칼슘은 소장에서 상층액인 가용성 칼슘 형태로 흡수되므로 가용성 칼슘의 양의 증가는 소장 내 칼슘 흡수율의 향상을 의미한다. 분석은 *In vitro*와 같은 OCPC법을 이용한다.

나. 호르몬 분비

1) $1,25-(\text{OH})_2$ -비타민 D

$1,25-(\text{OH})_2$ -비타민 D는 radioimmunoassay(Diasorin)를 이용하여 측정한다. 혈중에 이온화된 칼슘의 농도가 낮아지면 신장에서 $1,25-(\text{OH})_2$ -비타민 D의 생산을 증가시키도록 조절하고, 따라서 장에서 칼슘의 흡수가 증가하게 되므로 투여 전과 후를 비교하여

1,25-(OH)₂-비타민 D의 감소 정도를 확인한다.

2) Parathryroid hormone(PTH)

혈장 중 PTH는 radioimmunoassay(INCSTAR Corporation, Stillwater, MA)를 이용하여 측정한다. 혈중에 이온화된 칼슘의 농도가 낮아지면 PTH 분비가 증가하게 되고, 따라서 장에서 칼슘의 흡수가 증가하게 되므로 투여 전과 후를 비교하여 PTH의 감소 정도를 확인한다.

다. 유전자 발현

칼슘 흡수와 관련된 gene expression에 대하여 real-time reverse transcription polymerase chain reaction(real-time RT-PCR)을 이용하여 TRPV6, Calbindin-D9k, PMCA1b의 유전자 전사체(transcript)를 조사하여 유전자 발현의 증가 정도를 관찰한다.

3. 시험 설계 시 고려사항

가. 시험관시험

1) 시험계

인체소장상피세포주(Caco-2), 칼슘 용해성을 측정이 필요한 현탁액 등을 사용할 수 있다.

2) 바이오마커

시험물질의 작용 기전을 설명하기 위하여 예상되는 칼슘의 uptake 활성 및 유전자(TRPV6, Calbindin-D9k, PMCA1b) 발현 정도를 측정한다. 또는 kit를 이용하여 칼슘 용해성을 측정한다.

3) 통계처리

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

나. 동물시험

1) 시험대상

일반 실험동물(Sprague-Dawley, Wistar rat, ICR mice 등), 특이 모델을 사용 또는 칼슘 결핍식이 조건을 설정할 수도 있다.

2) 시험설계

가) 시험군은 정상군, 대조군으로 설정할 수 있다.

나) 일반적으로 식이에 혼합하여 시험물질을 공급하거나 강제 경구 투여할 수 있다.

3) 바이오마커

기능성 내용을 확인할 수 있는 혈청 칼슘 농도, 분과 뇨 중 칼슘 함량, 소장내용물 중 가용성, 불용성 칼슘 함량, 유전자(TRPV6, Calbindin-D9k, PMCA1b) 발현 정도 등의 바이오마커를 측정할 수 있다.

4) 통계처리

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

다. 인체적용시험

1) 시험대상

건강인, 청소년, 폐경기 여성 등을 대상으로 할 수 있다.

2) 주의사항

가) 칼슘 흡수 또는 신진 대사에 영향을 미치는 질병 가진 자, 장내 미네랄 흡수에 영향을 주거나 칼슘 대사에 영향을 미치는 약을 복용한 자는 제외한다.

나) 평소 식이를 유지하나, 가능한 칼슘이 포함된 음식은 섭취하지 않도록 한다.

다) 평소 신체 활동을 유지하도록 한다.

3) 시험설계

무작위배정, 위약대조연구(Randomized, controlled trial; RCT)를 기본으로 한다.

4) 바이오마커

인체적용시험에서 기능성 내용을 확인할 수 있는 지표로서 장내 칼슘 흡수율, 혈청 칼슘 농도, 분과 뇨 중 칼슘 함량, PTH, 1,25-(OH)₂-비타민 D 등의 바이오마커를 측정할 수 있다.

5) 통계처리

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

1. 서광희 등. 임상영양사를 위한 고급 영양학. 지구문화사. 2011.
2. 허채옥 등. 기초 영양학. 수학사. 2008.
3. 김덕희 등. 베이직 영양학. 지구문화사. 2016.
4. Dee Unglaub Silverthorn. 생리학 제4판. 라이프사이언스.
5. Diaz de Barboza G, Guizzardi S, Tolosa de Talamoni N. Molecular aspects of intestinal calcium absorption. World J Gastroenterol. 21(23): 7142-54. 2015.
6. 국민건강영양조사, 건강행태 및 만성질환 통계. 2015.
7. López-Huertas E, Teucher B, Boza JJ, Martínez-Férez A, Majsak-Newman G, Baró L, Carrero JJ, González-Santiago M, Fonollá J, Fairweather-Tait S. Absorption of calcium from milks enriched with fructo-oligosaccharides, caseinophosphopeptides, tricalcium phosphate, and milk solids. Am J Clin Nutr. 83(2): 310-6. 2006.
8. Yang LC, Wu JB, Ho GH, Yang SC, Huang YP, Lin WC. Effects of Poly- γ -glutamic Acid on Calcium Absorption in Rats. Biosci Biotechnol Biochem. 72(12): 3084-90. 2008.
9. Fukushima A, Aizaki Y, Sakuma K. Short-Chain Fatty Acids Induce Intestinal Transient Receptor Potential Vanilloid Type 6 Expression in Rats and Caco-2 Cells. J Nutr. 139(1): 20-5. 2009.

10. 이연숙, 문지영, 장수정, 박미나, 박희연. 흰쥐에서 불가사리칼슘의 체내이용성에 대한 칼슘흡수증진물질의 첨가 효과. J Korean Soc Food Sci Nutr. 36(7): 832-9. 2007.
11. 박지성, 박재우, 조병훈, 송성옥, 위성환, 오순민, 김진만. 유가공품 중 칼슘 및 프락토올리고당 영양강화 함량 분석. Korean J. Food Sci. An. 33(6): 781-6. 2013.
12. 이무진, 정호경, 심미옥, 장지훈, 김태묵, 이현주, 이기호, 안병관, 조정희, 장민철, 용주현, 김종춘, 조현우. 고함량 폴리감마글루탐산(PGA) 청국장에 대한 칼슘 생체이용률 및 골다공증에 미치는 영향. J Korean Soc Food Sci Nutr. 45(11): 1544-51. 2016.
13. 양혜란, 서정완, 김용주, 김재영, 류일, 심재건, 염혜원, 장주영, 정지아, 최광해. 소아청소년기의 비타민 D에 대한 최신 지견. Korean Journal of Pediatrics 52(10): 2009.
14. 박명규, 하태열, 신광순. 아스파르트산 킬레이트 칼슘의 칼슘 결핍에서의 생물학적 유용성. Korean J Nutr. 44(6): 474-80. 2011.
15. Tahiri M, Tressol JC, Arnaud J, Bornet FR, Bouteloup-Demange C, Feillet-Coudray C, Brandolini M, Ducros V, Pépin D, Brouns F, Roussel AM, Rayssiguier Y, Coudray C. Effect of short-chain fructooligosaccharides on intestinal calcium absorption and calcium status in postmenopausal women: a stable-isotope study. Am J Clin Nutr. 77(2): 449-57. 2003.
16. <http://www.tracesciences.com>
17. 건강기능식품공전 시험법 해설서. 식품의약품안전처. 2012.
18. Park C, Choi YH, Shin HJ, Poo HR, Song JJ, Kim CJ, Sung MH.

Effect of High-Molecular-Weight Poly- γ -Glutamic Acid from *Bacillus subtilis* (chungkookjang) on Ca Solubility and Intestinal Absorption. *J. Microbiol. Biotechnol.* 15(4): 855-8. 2005.

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서) - ‘칼슘 흡수 촉진에 도움을 줄 수 있음’ 편 -

발 행 인 : 이선희

편 집 위 원 장 : 홍진환

편 집 위 원 : 오금순, 권용관, 이화정, 허수정, 서일원, 서은채,
오재명, 구태현, 문명희, 강윤정, 신용운, 황경미,
배민주, 정태용, 성예지

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2017. 12. 28

문 의 처 : 영양기능연구팀(043-719-4428)



“청렴한 식약처 국민 안심의 시작”

공익신고자 보호제도란?

-공익신고자등(친족 또는 동거인 포함)이 공익신고등으로
인하여 피해를 받지 않도록 **비밀보장**, **불이익보호조치**,
신변보호조치 등을 통하여 보호하는 제도

♣보호조치 요구 방법

우편(30102) 세종특별자치시 도움5로 20 정부세종청사 7동, 국민권익위원회 공
익보호지원과/전화 044-200-7773/팩스 044-200-7949