

국내산 천연소재를 이용한 수면증진 건강기능식품 개발

Development of Functional Foods for Sleep-Enhancing from Domestic Natural Resources

김동수 | 공정기술연구단

Dong-Soo Kim | Processing Technology Research Group

서론

하버드 의대의 발표에 따르면(Harvard Medical School, 2008), 수면은 1.기억과 학습, 2.대사조절 및 체중, 3.안전사고(졸음운전, 근로사고 등), 4.기분(우울증, 활력저하), 5.심혈관 건강, 6.질환(면역력 저하, 암 저항력 저하, 비만 및 당뇨 유도 등) 등과 밀접하게 관련되어 있어 수면의 중요성을 강조하고 있다. 따라서, 불면증 등 수면장애 개선 및 수면의 질 향상은 국민건강 및 삶의 질을 높일 수 있는 매우 중요한 요소임은 틀림없다.

기본적으로 인간 수명에 있어서 1/3은 수면을 취하는 시간으로 건강 유지 및 정신적 안정에 있어 수면의 중요성은 매우 높고 최근의 식습관 변화(고에너지, 포화지방)로 인해 비만 및 대사증후군성인 질환의 유병률이 높아지고 있으며, 수면장애 및 스트레스가 동반되면서 각종 질병을 직간접적으로 유발하고 있어 이제는 국민보건상 수면의 중요성

을 국가차원에서도 관심을 가져야 할 때이다.

본 연구에서는 백하수오, 백자인, 구절초 및 측백엽 등 국내산 자원을 이용하여 수면증진 소재를 개발하고자 추출물의 수면증진 효과와 그 기작 그리고 효과성분 물질의 분리·동정을 실시하였고 최종적으로 임상실험을 실시하고 그 결과를 요약하여 보고하고자 한다.

불면증 및 수면 장애 현황

세계 인구의 1/4이 불면증을 경험하고 있으며 이중 10%는 만성 불면증을 겪고 있을 정도로 수면장애로 인한 문제가 확대되고 있다.(Mendelson et al., 2004)

미국 국립수면협회(National Sleep Foundation, 2005)의 조사에 따르면, 성인의 50% 정도가 1주일에 1회 이상 불면증 증상을 경험하였으며,

30~40%가 일과성 불면증(3주 지속), 10~15%는 만성적인 불면증(4주 이상 지속)을 호소하고 미국 국민의 50% 정도가 자신의 수면에 대해 만족하지 못하는 것으로 조사되었다.

본 연구팀의 사전 조사결과에 따르면, 약 40% 정도가 불면증을 경험한 것으로 나타났으며, 이중 46%는 이로 인한 불편함을 느끼고 있어 국내의 불면증 수준이 서구 선진국에 가까워지고 있음을 알 수 있었다.

세계적 수면학 권위자인 미국 Stanford 대학교의 Maurice M. Ohayon 교수는 한국인의 평균 수면시간은 6시간15분으로 미국(7시간) 및 영국(6시간45분)에 비해 적으며, 수면의 질도 떨어지는 것으로 조사되어 수면 시간과 질을 높여야 한다고 주장하고 있다(조선일보, 2008. 2. 26 인터뷰 기사).

국내의 수면증진 기능성식품 현황

국내 개별인정형 건강기능식품 및 기능성원료 가운데 수면증진 및 개선에 대한 제품은 2013년 2월 25일 기준으로 전무한 실정이며 미국 및 유럽의 선진국에서는 다양한 천연 수면보조제(natural sleep aids)들이 시장에 출시되고 있어 향후 외국 제품에 의해 국내시장이 잠식될 가능성이 있다.

근래 서울우유에서 ‘굿나잇 밀크’가 출시되었는데 2008년 히트상품으로 선정될 만큼 인기를 끌었으며, 이는 수면을 증진시키고자 하는 국내 소비자의 요구가 매우 높다는 것을 단적으로 보여주는 좋은 예이다. 개별인정을 받은 제품은 아니지만 최근 천호식품 및 안국건강에서 각각 ‘굿나잇’ 및 ‘굿슬립’이라는 수면증진에 도움이 되는 제품들이 기타가공품의 형태로 출시되고 있는데 두 제품 모두 이미 효과가 밝혀진 산조인(酸棗仁, 멧대

추씨, *Zizyphus jujuba* Miller)을 주요 소재로 하고 있는데 이는 중국에서 오랫동안 사용되어온 불면증 처방인 suanzaorentang의 주요 원료(Yi 등, 2007)이다.

미국의 경우 뉴욕타임즈에 따르면, 미국의 수면 관련 시장 규모는 200억 달러(23조원)로 Sleep Clinic이 급증하고 있으며, 기능성 매트리스, 천연 수면보조제(Herbal Sleep aids, 수면 증진 건강기능식품) 등의 수면 관련 제품의 시장이 확대되고 있고 신경의약품 중 수면제의 성장률이 약 20%로 가장 높게 나타났으며, 최근에는 선진국뿐만 아니라 개발도상국에서도 시장이 확대되고 있다(IMS World Review, 2006).

따라서 국내에서도 쉽게 알려져 있는 상추(재래종으로 추정됨)를 비롯하여, 백자인, 백하수오, 신선초, 인삼 등이 동의보감 등 한의학 고문헌 및 민간요법을 통해 알려져 있는 소재를 활용하여 수면 건강기능식품을 개발할 수 있는 다양한 식품 및 한방소재 들을 가지고 있지만 이를 이용한 연구개발한 사례는 없어 이에 대한 과학적인 연구 및 산업화가 필요한 실정이다.

재료 및 방법

본 실험에 사용된 구절초 및 측백엽은 경동시장에서 구입하여 사용하였고 백하수오는 서울시 동대문구 소재의 약업사에서 구입하여 사용하였으며 모든 제품은 국내산을 사용하였고 이를 원료로하는 추출물의 제조는 상법에 따라 수행하였다. 실험동물 ICR 마우스(100~22 g, male) 및 C57BL/6N mouse(28~30 g, male)를 (주)코아텍에서 분양받아 실험동물용 사육상자에 일주일간 적응된 후 실험에 사용하였다. 모든 동물들은 KFRI-IACUC

(Korea Food Research Institute Institutional Animal Care and Use Committee)의 실험동물 사용지침에 의해 관리되었다.

조사 항목으로는 GABAA benzodiazepine receptor binding assay, 5-HT_{2C} (Serotonin type 2C) receptor binding assay, 급성경구독성 시험, Pentobarbital-induced sleep test, 수면 구조 분석, 의사결정도 기법을 이용한 안전성 검토 (건강기능식품의 안전성 평가를 위한 의사결정도 적용, 식품의약품안전청, 2007), 및 반응표면분석법 (Response Surface Methodology)을 통하여 최적조건과 효능을 검증하고 수면 임상실험을 통하여 그 효능을 검증하였고 최종적으로 유효성분의 분리정제를 실시하였다.

연구결과 요약

In vivo 수면유도 효과

수면증진 소재를 탐색하기 위하여 대표적인 억

제성 신경전달 물질인 GABA의 type A receptor에 대한 결합력을 측정하였다. 백자인, 백하수오, 구절초 및 측백엽의 에탄올 추출물의 GABAA receptor에 대한 결합 억제활성을 분석한 결과, 10 mg/ml의 농도에서 각각 100%에 가까운 억제활성을 나타냈다(Fig. 1).

새로운 소재로 선택된 구절초와 측백엽의 선정 타당성을 증명하기 위하여, 추출된 각 추출물의 GABAA receptor에 대한 결합 억제활성을 분석한 결과, 두 물질의 IC₅₀ 값 모두 0.006 mg/ml, 0.005 mg/ml의 높은 억제활성을 나타내었음 이로서 이 두 식물이 후보식물로서 적합함을 확인하였다.

한편, 백자인과 백하수오의 에탄올 추출물의 5-HT_{2C} receptor에 대한 결합 억제활성을 분석한 결과, 10 mg/ml의 농도에서 각각 100%에 가까운 억제활성을 나타냈다. 백자인과 백하수오의 IC₅₀ 값은 각각 6.488 mg/ml 0.3965 mg/ml로 백하수오의 억제활성이 뛰어난 것을 확인할 수 있었고, 백하수오가 후보식물로서 적합함을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

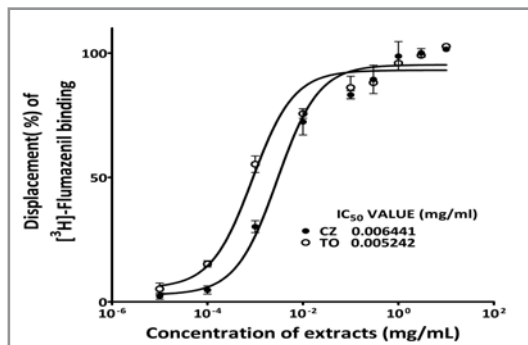


Fig. 1. *In vitro* [3H]-flumazenil binding inhibition of CZ and TO to GABAA-BZD receptor. CZ, *chrysanthemum zawadskii* var. L. extract; TO, *thunja orientalis* leaves extract. Each data point is expressed as mean \pm SD (n=3)

선택된 후보물질 백자인(TOS), 백하수오(CW), 구절초(CZ) 및 측백엽(TO)을 250 과 500 mg/kg의 농도로 마우스에 경구투여(p.o.)한 후 pentobarbital (45 mg/kg, i.p.)을 복강 주사하여 수면 유도 효과를 비교한 결과(Fig. 3) 백자인 에탄올 추출물(TOS)에서는 유의적인 수면 증진 효과가 나타나지 않았고 백자인(TOS)을 제외한 백하수오(CW), 구절초(CZ) 및 측백엽(TO) 에탄올 추출물에서 용량 의존적인 sleep latency의 감소($p < 0.01$)와 sleep duration의 증가($p < 0.01$)를 보였다.

최종적으로 4개의 후보소재 중 수면효과가 전혀 없는 백자인을 제외하고 수면효과가 높게 나타난 백하수오(CW), 구절초(CZ) 및 측백엽(TO)을 선택하였으며 백하수오, 구절초 및 측백엽은 대표적인 민간약물로 다양한 효능을 지니고 있지만, 수면증진에 관한 연구는 진행된 바가 없다.

혼합추출물의 농도에 따른 수면시간 효과

추출물의 효능을 높이기 위하여 혼합추출물을

제조하고 반응표면분석법 (Response Surface Methodology)을 통하여 얻어진 최적제조 조건하에서 제조된 백하수오(CW), 구절초(CZ) 및 측백엽(TO) 에탄올 추출물을 중량 기준 2:4:4의 비율로 혼합한 혼합물(CCT)을 100, 250, 500 및 1,000 mg/kg의 농도로 경구투여(p.o.)한 후 pentobarbital (45 mg/kg, i.p.)에 의한 수면 유도 효과를 알아보았다. 이 결과, 유의적인 sleep latency의 감소($p < 0.01$)와 용량 의존적인 sleep duration의 증가($p < 0.01$)를 나타내었고 혼합추출물(CCT) 100 mg/kg의 낮은 농도에서는 수면효과가 나타나지 않았지만, 250, 500, 1,000 mg/kg의 농도에서 높은 수면효과를 나타냈으며 1,000 mg/kg의 농도에서는 positive control인 DZP과 비슷한 수준으로 증가된 sleep duration을 확인 할 수 있었다.

총 수면시간(total sleep time)은 렘수면(REM sleep, rapid eye movement), 논렘수면(NREM sleep, non-rapid eye movement) 시간의 합으로 나타내었다(Fig. 4). Control은 평균 436.4분으로 총 수면시간이 가장 짧았고 positive control인 DZP는 557.9분이고 농도가 250 mg/kg 일

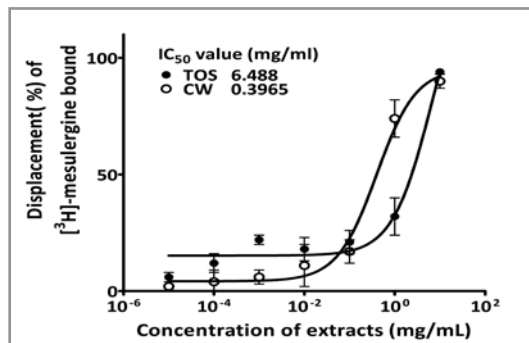


Fig. 2. *In vitro* [3H]-mesulergine binding inhibition of TOS and CW to 5-HT_{2C} receptor. CW, *cynanchum wilfordii* Hemsley extract; TOS, *thunja orientalis* L. seed extract. Each data point is expressed as mean±SD (n=3)

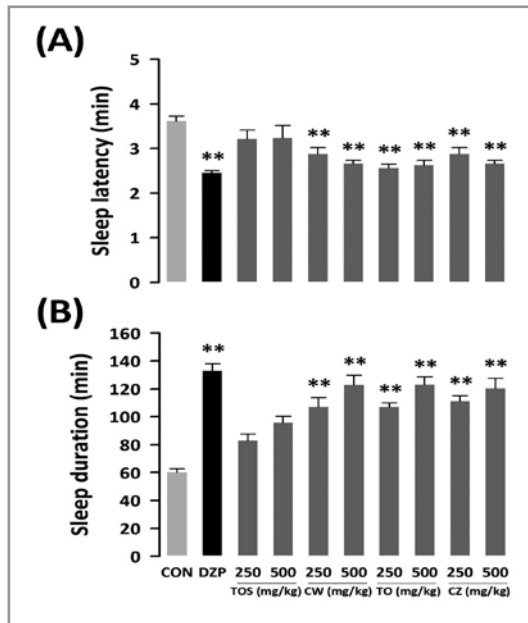


Fig. 3. Effects of TOS, CW, TO and CZ on sleep latency (A) and sleep duration (B) in mice induced by hypnotic dose (45 mg/kg, i.p.) of pentobarbital. Mice received pentobarbital 45min after oral administration (p.o.) of CON (0.5% CMC–saline 10 mL/kg), DZP (2 mg/kg). Each column represents mean \pm SEM (n=10). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, significant as compared to the control group (Dunnett's test). Abbreviations: CON, control group; DZP, diazepam; TOS, *Thuja orientalis* seed ethanol extract; CW, *Cynanchum wilfordii* ethanol extract; TO, *Thuja orientalis* leaf ethanol extract; CZ, *Chrysanthemum zawadskii* ethanol extract

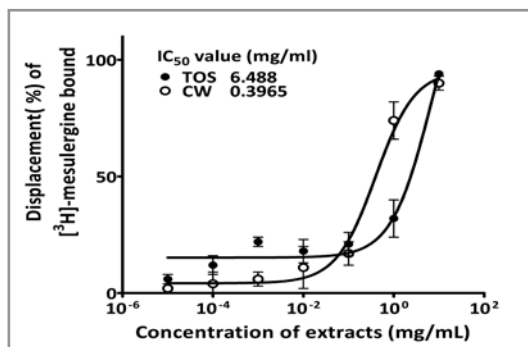


Fig. 4. Effects of CW, CZ, TO and CCT on total sleep time in C57BL/6N mouse. Each column represents mean \pm SEM (n=8). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, significant as compared to the control group (Dunnett's test). Abbreviations: CON, control group; DZP, diazepam; CW, *Cynanchum wilfordii* ethanol extract; CZ, *Chrysanthemum zawadskii* ethanol extract; TO, *Thuja orientalis* leaf ethanol extract; CCT, *Cynanchum wilfordii* ethanol extract (20%); *Chrysanthemum zawadskii* ethanol extract (40%); *Thuja orientalis* leaf ethanol extract(40%)

때 백하수오 추출물이 514.5분, 구절초 추출물이 456.9분, 측백엽 추출물이 470.5분 그리고 혼합추출물이 523.6분으로 혼합추출물의 총 수면시간이 가장 길었으며 백하수오 추출물, 측백엽 추출물, 구절초 추출물 순이었으므로 나타났다.

한편, 250 mg/kg 농도일 때 구절초 추출물과 측백엽 추출물에서는 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 500 mg/kg의 농도에서는 모두 유의적인 차이가 나타났으며 그 효과가 DZP와 유사하였다.

백하수오, 측백엽 및 구절초는 한반도가 원산인 한국의 특산 약용식물로 오래전부터 사용되어 온 중요한 식물 중의 하나로 백하수오, 측백엽 및 구절초를 이용한 많은 연구가 이루어지고 있지만, 수

면증진에 관한 연구는 진행된 바가 없기 때문에 산업적으로 큰 효과를 지닐 것으로 판단되었다.

수면유도 소재의 독성평가

백하수오 에탄올 추출물(CW), 구절초 에탄올 추출물(CZ), 측백엽 에탄올 추출물(TO) 및 혼합추출물(CW 20 : CZ 40 : TO 40)을 4주령의 ICR mouse 암수 10마리로 구성된 각 시험군에서 1,500 및 3,000 mg/kg의 농도로 경구투여(p.o.)하여 14일간 관찰한 사망 예를 Table 1에 나타내었다.

경구투여 후 모든 샘플에서 시험기간 동안 사망

Table 1. Survivals in ICR mice orally administered CW, CZ, TO and CCT

Groups	Sex	Dosage (mg/kg)	Days after treatment								Final survivals	
			1	2	3	4	5	7	10	14		
Control (saline-CMC)	Male	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
	Female	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
CW	Male	1,500	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		3,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
	Female	1,500	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		3,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
CZ	Male	1,500	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		3,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
	Female	1,500	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		3,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
TO	Male	1,500	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		3,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
	Female	1,500	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		3,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
CCT (CW 20 : CZ 40 : TO 40, w/w)	Male	1,500	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		3,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
	Female	1,500	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10
		3,000	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10/10

CW, *Cynanchum wilfordii* ethanol extract; CZ, *Chrysanthemum zawadskii* ethanol extract; TO: *Thuja orientalis* leaf ethanol extract; CCT, *Cynanchum wilfordii* ethanol extract (20%): *Chrysanthemum zawadskii* ethanol extract (40%): *Thuja orientalis* leaf ethanol extract(40%)

예가 발생하지 않았으며, 14일간 임상증상을 관찰 하였을 때 특별한 의심증상 및 비특이적인 중독 증상 또한 나타나지 않았다. 투여 1시간 이후 CW, CZ, TO 및 CCT 그룹들의 경우 대조군에 비해 진 정효과를 나타내었으며, 다음날부터는 대조군과 마찬가지로 정상적인 움직임을 나타냈다.

급성경구독성시험 평가 시 경구투여 후 사망 예 가 보통 6시간 안에 나타나는 것에 비해 본 실험에 서는 사망 예가 나타나지 않았고, 실험기간 동안 별다른 임상 증상이 나타나지 않았다.

한편, 백하수오 에탄올 추출물(CW), 구절초 에 탄올 추출물(CZ), 측백엽 에탄올 추출물(TO) 및 혼합추출물(CW 20 : CZ 40 : TO 40)을 4주령의 ICR mouse 암수 10마리로 구성된 각 시험군에서 1,500 및 3,000 mg/kg의 농도로 경구투여(p.o.) 하여 14일간 관찰한 체중 증감의 변화는 Fig. 5에 나타내었다.

시험물질 투여군과 대조군 모두 시험기간 14일 동안 정상적인 체중의 증가를 보였으며, male 및 female 그룹 간의 체중 변화율도 차이를 보이지

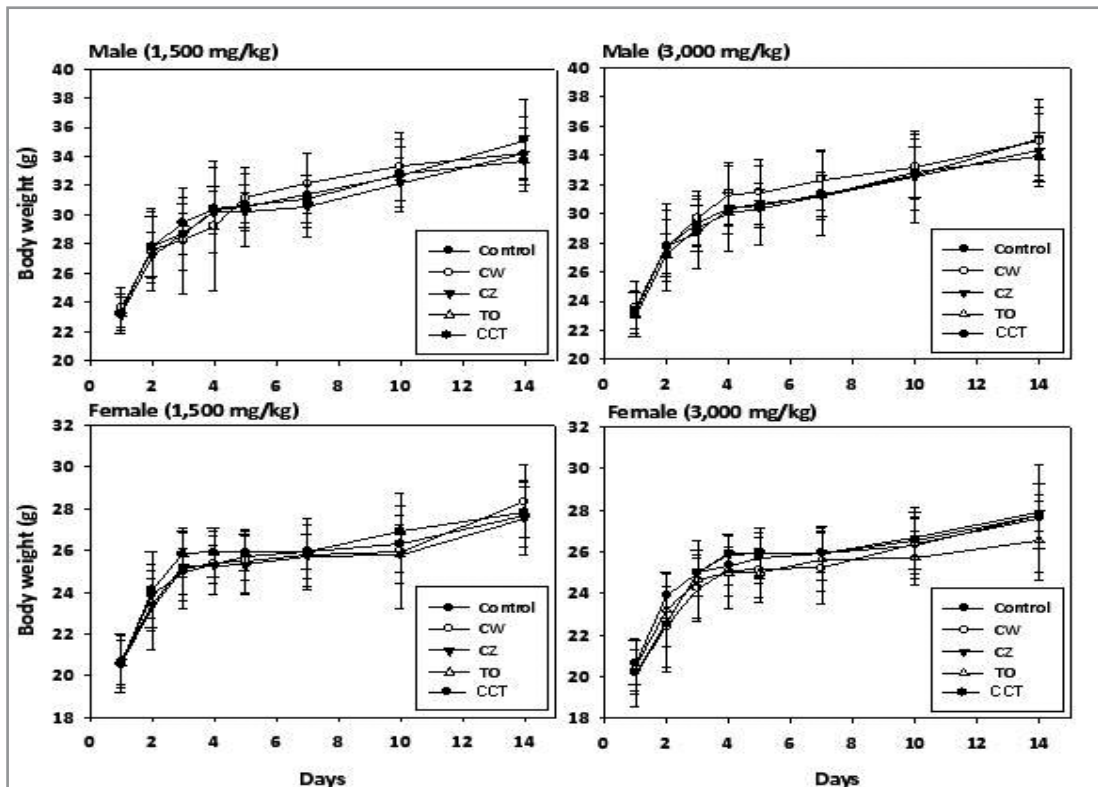


Fig. 5. Changes in body weight in ICR mice orally administered CW, CZ, TO and CCT. CW, *Cynanchum wilfordii* ethanol extract; CZ, *Chrysanthemum zawadskii* ethanol extract; TO: *Thuja orientalis* leaf ethanol extract; CCT, *Cynanchum wilfordii* ethanol extract (20%): *Chrysanthemum zawadskii* ethanol extract (40%): *Thuja orientalis* leaf ethanol extract(40%)

않았다.

시험물질 투여 후 14일 후 시험 종료 된 모든 동물을 대상으로 부검을 실시하였으나 특이할 만한 해부소견은 관찰되지 않았다.

혼합추출물과 시판 수면증진식품의 농도에 따른 입면시간(sleep latency)과 총 수면시간(total sleep time)의 변화

Sleep latency는 추출물을 경구투여(p.o.)하고 뇌파측정을 시작한 후 10초 epoch 단위의 NREM 수면이 12번 이상 연속적으로 나타난 첫 epoch에 도달하는데 걸리는 시간으로 정의 하였고 Fig. 6에 나타내었다. Control은 평균 46.1분으로 입면시간이 가장 오래 걸렸고 positive control인 DZP는 23.9분이었다.

농도가 250 mg/kg 일 때 국내 A사 시판품이 39.8분, 국외 B사 시판품이 42.9분 그리고 혼합추출물이 43.3분으로 대조군에 비하여 입면시간이 감

소하였지만 각 제품간의 차이는 크게 나타나지 않았다.

250 mg/kg 농도일 때 국내 A사 시판 제품만 유의적인 감소가 나타났으며 500 mg/kg 농도에서는 국내 A사 시판 제품을 제외하고 250 mg/kg 농도에서 보다 입면시간이 더욱 짧아 졌으며 특히 혼합추출물의 경우 500 mg/kg 농도에서 가장 우수하였다.

이로 미루어 보아 시판 제품과의 비교에서 수면 보조제로써의 가능성을 확인하였음.

총 수면시간(total sleep time)은 렘수면(REM sleep, rapid eye movement), 논렘수면(NREM sleep, non-rapid eye movement) 시간의 합으로 나타내었다(Fig. 7). Control은 평균 436.4분으로 총 수면시간이 가장 짧았고 positive control인 DZP는 557.9분이었다. 농도가 250 mg/kg 일 때 국내 A사 제품은 511.4분, 국외 B사 제품은 515.2분, 그리고 혼합추출물은 523.6분으로 혼합추출물의 총 수면시간이 가장 길었다. 모든 농도와 제품에서 유의적인 차이가 나타났고 농도 의존적으로 총

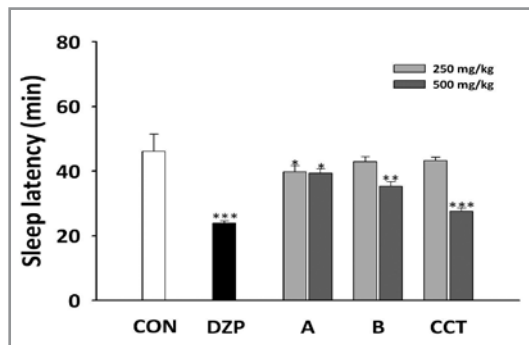


Fig. 6. Effects of A, B and CCT on sleep latency in C57BL/6N mouse. Each column represents mean \pm SEM (n=8). * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, significant as compared to the control group (Dunnnett's test). Abbreviations: CON, control group; DZP, diazepam; A, domestic commercial product; B, commercial product in USA; CCT, *Cynanchum wilfordii* ethanol extract (20%); *Chrysanthemum zawadskii* ethanol extract (40%); *Thuja orientalis* leaf ethanol extract(40%)

수면시간이 향상 되었으며 그 효과가 수면제로 사용되고 있는 DZP와 유사하였다.

혼합추출물이 기존의 시판 제품에 비하여 월등히 우수하였고, 천연수면보조제로써의 가능성을 입증하였다.

수면유도 소재의 *in vivo* mechanism 연구

가장 일반적으로 사용되는 수면제들이 GABAA 수용체에 작용하기 때문에 외국에서 수면제로 사용되는 허브류에서도 GABAA 수용체에 대한 작용기작에 초점을 맞추고 있다. 따라서 측백엽(TO) 및 구절초(CZ) 에탄올 추출물의 *in vivo* 작용기작을 GABAA-benzodiazepine receptor에 반응하는 GABAA-benzodiazepine receptor antagonist인 flumazenil을 이용한 동물실험을 수행하였다(Fig. 8, 9).

Flumazenil은 수용성 imidazobenzodiazepine으로 중추신경계의 GABAA receptor에 diazepam

과 함께 경쟁적으로 작용함으로써 길항 작용을 하게 되어 진정, 수면을 억제하며(Johnston *et al.*, 2006), diazepam에 의한 부작용 발현 시 해독제로 사용되고 있다.(Lee, 1999) 측백엽(TO) 및 구절초(CZ) 에탄올 추출물을 1,000 mg/kg의 농도로 경구투여(p.o.) 하기 10분전 8 mg/kg의 flumazenil을 복강 주사(i.p.)한 후 pentobarbital (45 mg/kg, i.p.)로 수면을 유도한 결과 control 그룹은 flumazenil 투여에 의해 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며, DZP(2 mg/kg)과 측백엽(TO) 및 구절초(CZ) 에탄올 추출물(1,000 mg/kg)은 기대대로 유의적인 sleep latency의 감소($p < 0.01$)와 sleep duration의 증가($p < 0.01$)를 나타냈다. 측백엽(TO) 및 구절초(CZ) 에탄올 추출물에서 flumazenil에 의한 길항작용으로 인해 유의적으로 sleep latency가 증가($p < 0.01$)하였고 sleep duration이 감소($p < 0.01$)하였다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 측백엽(TO) 및 구절초(CZ) 에탄올 추출물은 DZP과 같이 GABAA receptor의 agonist로 작용하는 성분들을 함유하고 있다는 것을 의미하였다.

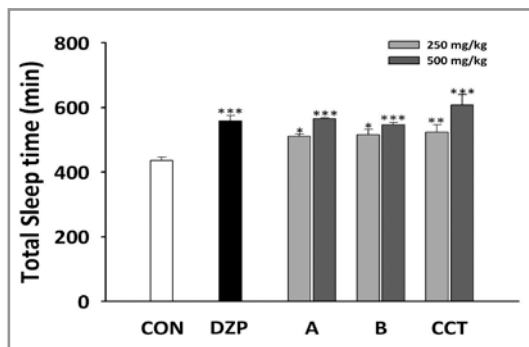


Fig. 7. Effects of A, B and CCT on total sleep time in C57BL/6N mouse. Each column represents mean \pm SEM (n=8). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, significant as compared to the control group (Dunnett's test). Abbreviations: CON, control group; DZP, diazepam; A, domestic commercial product; B, commercial product in USA; CCT, *Cynanchum wilfordii* ethanol extract (20%); *Chrysanthemum zawadskii* ethanol extract (40%); *Thuja orientalis* leaf ethanol extract(40%)

기능성 물질의 분리·동정

구절초(*Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*) 에탄올 추출물로 얻은 정유의 GC-MS 결과 동정된 성분들을 Table 2과 Fig. 10에 나타내었다. 정유성분은 주로 terpene류로 다른 수종의 정유성분보다 구성 물질의 수가 적었고 구절초 에탄올 추출물의 정유성분의 주성분은 (-)- α -pinene 이고, 그 다음으로는 δ -3-carene, β -thujone, anethole, β -myrcene, β -caryophyllen 순으로 비교적 많이 존재하였음, 구절초 에탄올 추출물의 정유성분의 대부분은 GC-MS분석 시 11,598분에

서 37.670분 사이의 retention time에서 검출되었다.

따라서, 구절초의 정유성분은 비슷한 극성을 가진 몇 가지의 물질로 구성되어 있으며, 나머지 성분들이 소량으로 존재함을 알 수 있다.

본 실험에서 사용한 구절초에서의 정유성분의 주성분은 국화과(Compositae) 식물 및 구절초의 주요 성분과 동일한 것으로 나타났고 구절초의 정유성분으로 α -pinene은 6.7%, β -caryophyllen이 4.8%(Usman et al., 2010)이나 α -pinene은 8.17%, β -thujone 2.87%, β -caryophyllen 0.97% 함유하고 있는 것으로 보고되어 있다(Youn

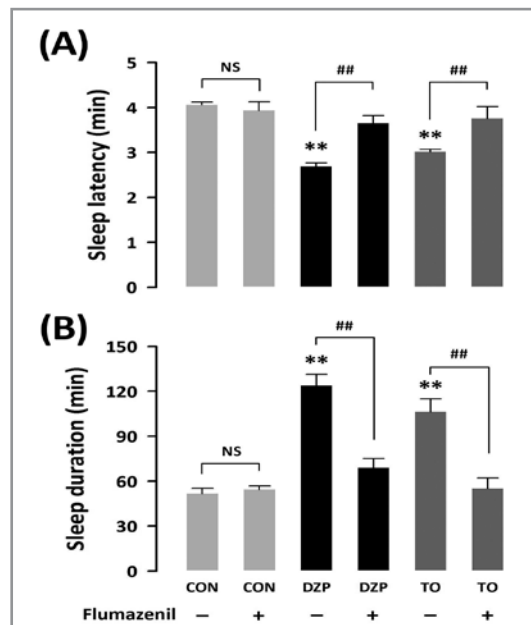


Fig. 8. Effects of flumazenil on the changes in sleep latency (A) and sleep duration (B) induced by DZP and TO. Mice received pentobarbital 45min after oral administration (p.o.) of CON (0.5% CMC-saline 10 mL/kg), DZP (2 mg/kg) and TO (1,000 mg/kg). flumazenil (8 mg/kg, i.p.) was administered 10 min before oral administration. Each column represents mean \pm SEM (n=10). * p<0.05, ** p<0.01, significant as compared to the control group (Dunnett's test). # p<0.05, ## p<0.01, significant between co-administration and single administrations (unpaired Student's t-test); NS, no significant. Abbreviations: CON, control group; DZP, diazepam; TO, *Thuja orientalis* leaf ethanol extract

et al., 2008).

구절초와 같은 국화과 식물인 서양톱(Yarrow)의 잎에서는 α -pinene이 14.4%의 정유 성분을 함유하고 있음(Shafaghat et al., 2009), 국화과 서양 등골나물 잎(Eupatorium L.)에서 α -pinene은 0.2% β -caryophyllen이 7.2% 함유 하는 것으로 보고되어 있다(Mehdi et al., 2005).

측백엽(Thuja orientalis leaves) 에탄올 추출물로 얻은 정유의 GC-MS 결과동정된 성분들을 Table 3과 Fig. 11에 나타내었다.

정유성분은 주로 terpene류로 다른 수종의 정

유성분 보다 구성물질의 수가 적었음 측백엽 에탄올 추출물의 정유성분의 주성분은 (-)- α -pinene 이고, 그 다음으로는 δ -3-carene, β -thujone, anethole, β -myrcene, β -caryophyllen 순으로 비교적 많이 존재하였다.

측백엽 에탄올 추출물의 정유성분의 대부분은 GC-MS분석 시 11.603분에서 37.669분 사이의 retention time에서 검출되었다. 따라서, 측백엽의 정유성분은 비슷한 극성을 가진 몇 가지의 물질로 구성되어 있으며, 나머지 성분들이 소량으로 존재함을 알 수 있었다.

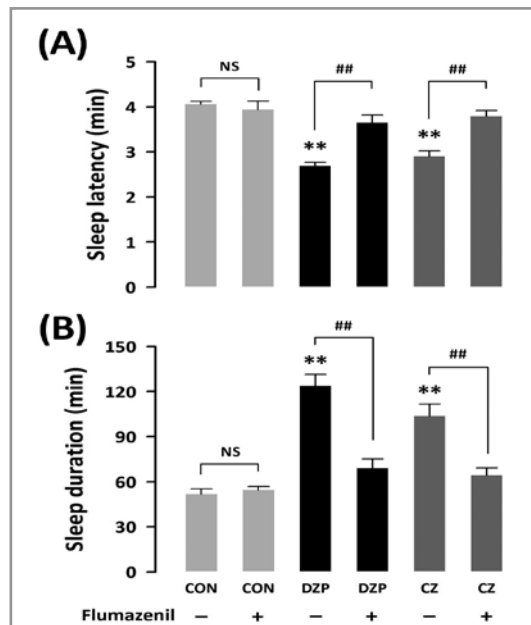


Fig. 9. Effects of flumazenil on the changes in sleep latency (A) and sleep duration (B) induced by DZP and CZ. Mice received pentobarbital 45min after oral administration (p.o.) of CON (0.5% CMC-saline 10 mL/kg), DZP (2 mg/kg) and CZ (1,000 mg/kg). flumazenil (8 mg/kg, i.p.) was administered 10 min before oral administration. Each column represents mean \pm SEM (n=10). *p<0.05, **p<0.01, significant as compared to the control group (Dunnett's test). # p<0.05, ## p<0.01, significant between co-administration and single administrations (unpaired Student's t-test); NS, no significant. Abbreviations: CON, control group; DZP, diazepam; CZ, *Chrysanthemum zawadskii* ethanol extract

Table 2. Chemical composition of essential oil extracted from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*

NO.	Compounds	Retention time(min.)	Essential oil composition(%)
1	(-)- α -pinene	11.598	1.757
2	norbornane	12.337	0.027
3	(+)-sabinene	13.664	0.088
4	(-)- β -pinene	13.844	0.037
5	β -myrcene	14.665	0.123
6	δ -3-carene	15.509	0.438
7	β -thujone	16.662	0.243
8	α -terpinolen	19.572	0.063
9	anethole	29.375	0.173
10	δ -2-carene	32.093	0.018
11	β -cedrene	34.905	0.031
12	β -caryophyllen	35.103	0.103
13	cedr-8(15)-ene	35.249	0.014
14	thujopsene	35.737	0.036
15	α -caryophyllen	36.605	0.052
16	(-)-germacerene d.	37.670	0.014

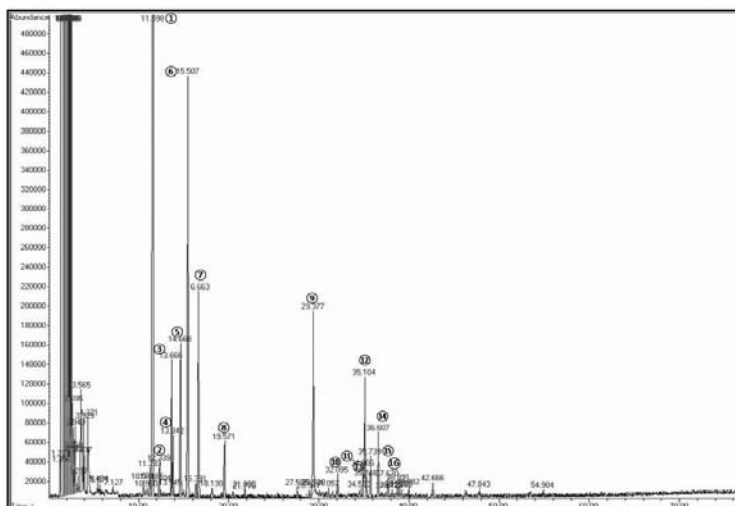


Fig. 10. GC Chromatogram of essential oil from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*. 1, (-)- α -pinene; 2, norbornane; 3, (+)-sabinene; 4, (-)- β -pinene; 5, β -myrcene; 6, δ -3-carene; 7, β -thujone; 8, α -terpinolen; 9, anethole; 10, δ -2-carene; 11, β -cedrene; 12, β -caryophyllen; 13, cedr-8(15)-ene; 14, thujopsene; 15, α -caryophyllen; 16, (-)-germacerene d

Table 3. Chemical composition of essential oil extracted from *Thuja orientalis* leaves

NO.	Compounds	Retention time (min.)	Essential oil composition (%)
1	(-)- α -pinene	11.603	1.890
2	norbornane	12.342	0.033
3	(+)-sabinene	13.669	0.096
4	(-)- β -pinene	13.850	0.042
5	β -myrcene	14.676	0.132
6	δ -3-carene	15.514	0.472
7	β -thujone	16.673	0.259
8	α -terpinolen	19.560	0.068
9	4-allylanisole	28.926	0.004
10	anethole	29.380	0.175
11	aniskampfer	29.526	0.002
12	(E)- β -farnesene	34.904	0.034
13	β -caryophyllen	35.102	0.104
14	(+)- β -funebrene	35.248	0.015
15	thujopsene	35.743	0.034
16	α -caryophyllen	36.610	0.051
17	(-)-germacerene d.	37.669	0.016

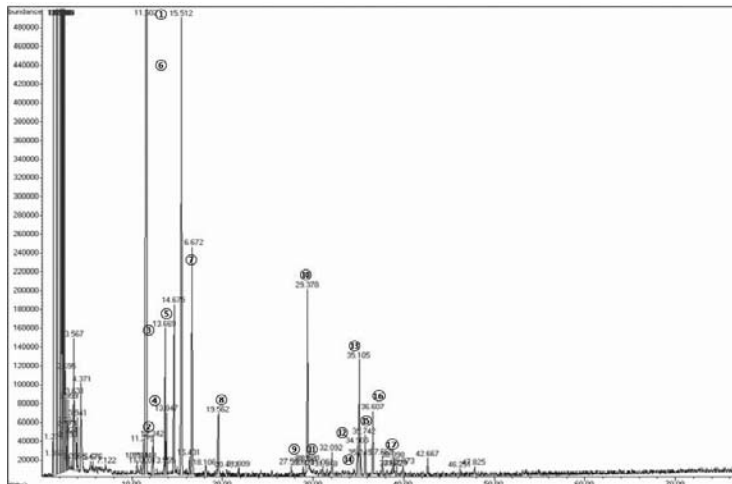


Fig. 11. GC Chromatogram of essential oil from *Thuja orientalis* leaves. 1, (-)- α -pinene; 2, norbornane; 3, (+)-sabinene; 4, (-)- β -pinene; 5, β -myrcene; 6, δ -3-carene; 7, β -thujone; 8, α -terpinolen; 9, 4-allylanisole; 10, anethole; 11, aniskampfer; 12, (E)- β -farnesene; 13, β -caryophyllen; 14, (+)- β -funebrene; 15, thujopsene; 16, α -caryophyllen; 17, (-)-germacerene d

측백엽의 정유성분은 (-)- α -pinene이 다른 성분보다 상대적으로 많은 것으로 실험을 통하여 확인을 하였고, 문헌에 의하면 α -pinene이 21.9%로 가장 많이 있고 α -cedrol이 20.3% δ -3-carene이 10.5%, β -caryophyllen이 3.0%로 나타나고 있는 것으로 알려져있다(Bahman *et al.*, 2003).

성분의 조성은 비슷하지만 함량에는 조금씩 차이를 보이는데 한국에 서식하는 7종의 측백엽의 정유성분을 분석한 것을 통해 알 수 있다. α -pinene은 경상남도 수목원에서 채취한 측백엽에서 10.91%로 가장 많은 함량을 차지하고 있으며 천리포 수목원에서 채취한 서양 측백엽에서는 α -pinene이 3.29%로 적은 양을 함유 하고 있고, δ -3-carene의 경우 경상남도 수목원에서 채취한 둥근 측백엽에서 11.36%로 가장 많은 함량을 보이고 있으며 경상남도 수목원의 측백엽에서는 4.99%로 낮은 양을 함유 하고 있다(조규갑 *et al.*, 2004).

수면 임상실험

3가지 식물 추출물 복합 조성물 구절초, 측백엽, 백하수오를 최적 조건에서 추출하였고 총 플라보노

이드 함량은 g 당 35.81 mg로 매우 많이 함유되어 있었다. 추출 후 여과 한 후 농축기로 감압농축 하고 농축액을 동결건조 후 분말화 한 후 캡슐에 담아 실험에 사용하였으며, 이는 수면증진 동물실험에 사용된 것과 동일하며 용량배합은 한 캡슐 당 500 mg으로 구절초: 200 mg : 측백엽 : 200 mg: 백하수오 : 100 mg(4:4:2)으로 구성하였다.

2010년 12월에서 2011년 3월까지 불면증상이 주 3회 이상 있다고 한 참가자 65명을 대상으로 구절초, 측백엽 및 백하수오로 이루어진 수면증진물질(Sleep-enhancing material)을 복용하는 실험군(32명)과 placebo를 복용하는 대조군(33명)으로 나누어 이중맹검법으로 비교하였다.

환자군에게는 수면검사 전 최소 14일간 어떤 약물도 복용하지 않도록 하였고, 진찰을 통해 내과적 질환이나 신경과적 질환이 없음을 확인하였다.

투여방법은 1차 수면다원검사 다음날부터 일주일간 복용하였으며, 마지막 날 2차 수면다원검사를 실시하였다(Fig. 12). 투여용량은 남자는 3 capsule(1500 mg) 여자는 3 capsule(1500 mg)로 설정하였다.

임상실험 참가자 중에 수면증진소재(sleep-enhancing material)를 복용하는 실험군은 남자



Fig. 12. Polysomnography testing of insomnia patient

Table 4. Demographic and clinical characteristics of Sleep-enhancing material and Placebo

	Sleep-enhancing material (N=32)	Placebo (N=33)
Gender(M/F)	(18/14)	(22/11)
Age(Mean±SD)	35.2±9.4	34.8±8.3
BMI(Mean±SD)	22.8±3.3	22.7±3.3

가 18명, 여자가 14명이었으며, 평균연령은 35.2 ± 9.4세, 체질량 지수(BMI)는 22.8 ± 3.3 이었다. Placebo를 복용하는 대조군은 남자가 22명, 여자가 11명이었으며, 평균연령은 34.8 ± 8.3, 체질량 지수(BMI)는 22.7 ± 3.3 이었다(Table 4).

수면증진 소재를 1 주일 복용한 후 설문지를 통한 불면증 증상에 대한 주관적 평가에서 본 연구에서 개발한 수면증진소재(구절초, 측백엽, 백하수오)가 불면증 개선에 효과를 보였다.

즉 연구 결과에서 잠이 드는데 걸리는 시간이 43.9분에서 31.3분으로 단축되었고, 또한, 총 수면 시간이 5.1시간에서 5.7시간으로 증가하였고, 자신의 수면에 대한 만족이 31.3%에서 62.5%로 크게 증가하였다. 불면증 지수(불면의 정도와 불면으로 인해 일상생활에 지장을 받는 정도)를 0-28점의 지수로 표현하며 실험군은 14.5에서 8.9로 저하되었

고 불면증의 증상이 잠이 들기 힘들고(입면장애), 자주 깨는(유지 장애) 증상으로 인하여 수면에 대한 불만족도가 증가하는 것인데 본 연구에서는 건강수면 식품이 불면증상을 호전시키는 결과를 얻었으며, 총 수면시간도 증가하는 결과를 나타내었다(Table 5).

수면증진 소재 투여 전후의 수면다원검사 결과에서는 통계적인 유의성은 없었으나 총수면시간의 증가, 수면효율의 증가, 각성횟수, 서파수면의 증가를 나타내었다(Table 6).

불면증의 진단과 평가는 주관적인 평가에 의거하므로 설문지 등을 포함한 주관적 평가를 통해서 불면증의 호전여부를 측정하는데 본 연구 결과 역시 수면다원검사에 의거한 평가에서는 한계가 있었으나 설문지를 통한 주관적 평가에서는 대상 환자의 불면증증상이 호전되었음을 밝히는 결과를 얻었다.

결론적으로 본 연구 사업에서 개발한 수면증진소

Table 5. Comparison of baseline and after treatment in Sleep-enhancing material on Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI)

	Baseline (N=32)	1 week (N=32)	Paired t-test P-value (two-tailed)
Time to bed (h)	23.9±1.3	23.8±1	NS
Sleep latency (min)	43.9±38.8	31.3±24.4	0.008
Time to wake up (h)	6.3±0.9	6.5±0.8	0.028
Total sleep time (hr)	5.1±1.5	5.7±1.4	0.002
ISI (Insomnia scale index)	14.5±6.6	8.9±4.6	0.000

Table 6. Comparison of baseline and after treatment in Placebo on Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI)

	Baseline (N=33)	1 week (N=33)	Paired t-test P-value (two-tailed)
Time to bed (h)	24.1±1.3	24±1.3	NS
Sleep latency (min)	37.9±34.7	35.8±34.8	NS
Time to wake up (h)	6.4±0.9	6.5±0.9	NS
Total sleep time (hr)	5.2±1.4	5.4±1.4	NS
ISI (Insomnia scale index)	14.6±6.9	11.2±5.7	0,000

재(구절초, 측백엽, 백하수오)가 불면증을 완화시키고 수면의 질을 향상시키는데 영향을 미치는 것으로 확인되었으며, 과학적으로 규명된 본 연구 결과에 따라 부가가치가 높은 기능성 수면증진식품을 개발할 수 있을 것으로 여겨진다.

한 시제품의 제조공정도를 나타내었고, Fig. 15는 한국식품연구원이 개발한 수면증진 식품 시제품을 나타내었다.

요약

시제품 가공공정

다음 Fig. 13, 14는 에탄올과 초임계 추출에 의

본 연구를 통해 백하수오, 구절초 및 측백엽의 수면 증진 효과를 처음으로 과학적으로 규명하고 수면 증진을 위한 기능성 식품을 개발하였다(Fig. 15).



Fig. 13. Manufacturing procedure of natural sleep aids by ethanol extraction

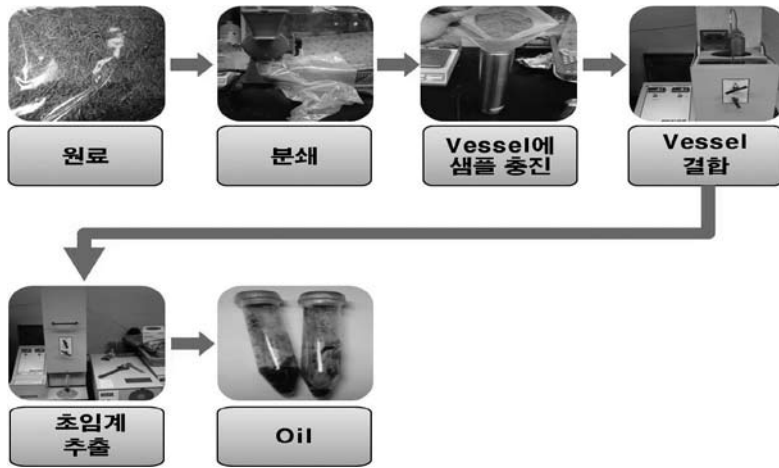


Fig. 14. Manufacturing procedure of natural sleep aids by supercritical extraction

펜토바비탈 수면유도 실험과 설치류 수면구조 (sleep-wake) 실험에서 백하수오, 구절초 및 측백엽 추출물 모두 농도 의존적으로 수면 증진효과를 보였다.

반응표면 분석법을 이용하여 활성이 가장 우수한 제조 조건과 추출물의 배합비를 최적화하였다.

기능 성분으로는 측백엽과 구절초로부터 (-)- α -pinene (+)-3-carene을 동정하였다. (-)- α

-pinene (+)-3-carene이 GABA type A receptor의 agonist로서 세포의 억제성 신경전달을 증대시켜 수면증진 효과가 있다는 것을 brain slice patch 및 *in vivo* 수면증진 효능 평가를 통해 처음으로 입증하였다.

임상실험 결과 수면다원검사에 의해 한계는 있었으나 설문지를 통한 주관적 평가에서 유의적으로 불면증상이 호전된 것으로 나타났다.



Fig. 15. Natural sleep aids developed by Korea Food Research Institute

최종 시제품을 국내외 유명 제품과 비교한 결과, 수면증진 효과가 유사하거나 조금 높은 수준으로 제품화가 가능할 것으로 기대되었다. 이러한 결과

를 종합해 볼 때 백하수오, 구절초 및 측백엽을 이용한 수면증진 기능성 식품의 산업화 가능성이 매우 높을 것으로 기대된다.

본 연구는 보건복지부에서 지원한 보건의료기술 진흥사업의 연구비로 수행된 결과입니다.

● 참고문헌 ●

1. Beecher GR, Overview of dietary flavonoids: Nomenclature, occurrence and intake, *J Nutr*, **133**(10), 32485-32545, 2003
2. Byun YH, Analysis of Composition and Activity of Essential Oil from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* and *C. indicum* against Antibiotic-Resistant Pathogenic Bacteria, *Natural Product Sciences*, **14**(2), 138-142, 2008
3. Byun YH, Shin SW, Analysis of composition and activity of essential Oil from *chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* and *C. indicum* against antibiotic-resistant pathogenic bacteria, *Natural Product Sciences*, **14**(2), 138-142, 2008
4. Chae IG, Kim HJ, Yu MH, Kim HI, Lee IS, Antioxidant and antibacterial activity of commercially available herbs in Korean markets, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **39**(10), 1411-1417, 2010
5. Choi IS, Effects of seeding ages on growth and yield of *Cynanchum wilfordii* Hemsly, *Korean J Medicinal crop Sci*, **6**(2), 121-125, 1998
6. Cambell EL, Chebib M, Johnston GAR, The dietary flavonoids apigenin and (-)-epigallocatechin gallate enhance the positive modulation by diazepam of the activation by GABA of recombinant GABAA receptors, *Biochemical pharmacology*, **68**(8), 1631-1638, 2004
7. Fang XS, Hao JF, Zhou HY, Zhu LX, Wang JH, Pharmacological studies on the sedative-hypnotic effect of *Semen Ziziphi spinosae* (Suanzaoren) and *Radix et Rhizoma Salviae miltiorrhizae* (Danshen) extracts and the synergistic effect of their combinations, *Phytomedicine*, **17**(1), 75-80, 2010
8. Guleriaa S, Kumarb A, Tikua AK, Chemical Composition and Fungitoxic, Activity of Essential Oil of *Thuja orientalis* L. Grown in the North-Western Himalay, India *Z Naturforsch*, **63**, 211-214, 2008
9. Harnischfeger G, Stolze H, *Bewährte Pflanzendrogen in Wissenschaftund Medizin*, Notamed Verlag. Bad Homburg/

- Melsungen, 250–259, 1983
10. Hanrahan JR, Semisynthetic preparation of amentoflavone: A Negative Modulator at GABAA receptors, *Bioorganic & Medicinal chemistry letters*, **13**(4), 2281–2284, 2003
 11. Ismail M, Central Properties and Chemical Composition of *Ocimum basilicum* Essential Oil, *Pharmaceutical Biology*, **44**(8), 619–626, 2006
 12. Johnston GAR, GABAA Receptor Channel Pharmacology, *Current Pharmaceutical Design*, **11**, 1867–1885, 2005
 13. Johnston GAR, Hanrahan JR, Chebib M, Duke RK, Mewett KN, Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin, *Advances in Pharmacol*, **54**, 285–316, 2006
 14. Kim DH, Seo JC, Im SC, Jeong TY, Han SW, The scavenging effect on NO, DPPH and inhibitory effect on IL-4 in radix *Cynanchi wilfordii* herbal-acupuncture solution, *J. of Kor. Acup. & Moxi. Soc.*, **20**(4), 42–52, 2003
 15. Kim HS, Effects of *Cynanchum wilfordii* extract on serum lipid components and enzyme activities in hyperlipidemic and streptozotocin-induced diabetic rats, *Korean journal of human ecology*, **7**(2), 1–11, 2004
 16. Kim MS, Baek JH, Park JA, Hwang BY, Kim SE, Lee JJ, Kim KW, Wilfoside K1N isolated from *Cynanchum wilfordii* inhibits angiogenesis and tumor cell invasion, *International Journal of Oncology*, **26**(6), 1533–1539, 2005
 17. Lee CM, Wong HN, Chui KY, Choang TF, Hong PM, Chang HM, Miltirone, a central benzodiazepine receptor partial agonist from a Chinese medicinal herb *Salvia miltiorrhiza*, *Neuroscience Letters*, **127**(2), 237–241, 1991
 18. Lee SH, Lee JS, Production and characteristics of antidandruff compound from *Chrysanthemum zawadskii*, *Korean J Microbiol Biotechnol*, **35**(3), 220–225, 2007
 19. Lee SK, Extractives from the leaves of *Thuja orientalis* Linnaeus, *J Kor For En*, **21**(1), 56–64, 2002
 20. Lu Y, Liu Z, Wang Z, Wei D, Quality evaluation of *platycladus orientalis* (L.) Franco through simultaneous determination of four bioactive flavonoids by high-performance liquid chromatography, *J of pharmaceutical and biomedical analysis*, **41**(4), 1186–1190, 2006
 21. Lu YH, Liu ZY, Wang ZT, Wei DZ, Quality evaluation of *Platycladusorientalis*(L.) Franco through simultaneous determination of four bioactive flavonoids by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**(4), 1186–1190, 2006
 22. Mirza M, Navaei MN, Dini M, Volatile constituents of essential oils isolated from flowers and leaves of *Eupatorium cannabinum* L, from Iran, *Iranian Journal of*

- Pharmaceutical Research, **5**(2), 149–152, 2006
23. Mizokami A, Tanaka H, Ishibashi H, Umabayashi H, Fukami K, Takenawa T, Nakayama KI, Yokoyama T, Nabekura J, Kanematsu T, Hirata M, GABA(A) receptor subunit alteration-dependent diazepam insensitivity in the cerebellum of phospholipase C-related inactive protein knockout mice, *Journal of Neurochemistry*, **114**(1), 302–310, 2010.
24. Nickavara B, Aminb G, Parhamib S, Volatile Constituents of the Fruit and Leaf Oils of *Thuja orientalis* L. Grown in Iran, *Z Naturforsch*, **58**, 171–172, 2003
25. Naser B, Bodinet C, Tegtmeier M, Lindquist U, *Thuja occidentalis* (Arbor vitae): A Review of its Pharmaceutical, Pharmacological and Clinical Properties, *Evid Based Complement Alternat Med*, **2**, 69–78, 2005
26. Park JW, Lee YJ, Yoon LS, Total flavonoids and phenolics in fermented soy products and their effects on antioxidant activities determined by different assays, *Korean Soc Food Cul*, **22**, 353–358, 2007
27. Rice-Evans C, Flavonoid antioxidants, *Current Medicinal Chemistry*, **8**(7), 797–807, 2001
28. Risa J, Risa A, Adersen A, Gauguin B, Stafford GI, Van Staden J, Jäger AK, Screening of plants used in southern Africa for epilepsy and convulsions in the GABAA-benzodiazepine receptor assay, *J Ethnopharmacol*, **93**(2–3), 177–182, 2004
29. Seo JY, Lim SS, Park J, Lim JS, Kim HJ, Kang HJ, Park JHY, Kim JS, Protection by *Chrysanthemum zawadskii* extract from liver damage of mice caused by carbon tetrachloride is maybe mediated by modulation of QR activity, *Nutr Res Pract*, **4**(2), 93–98, 2010
30. Seo WT, Extraction and biological activities of essential oil from *Thuja occidentalis* leaves, *Korean J Medicinal Crop Sci*, **11**, 364–370, 2003
31. Shinomiya K, Fujimura K, Kim Y, Kamei C, Effects of valerian extract on the sleep-wake cycle in sleep-disturbed rats. *Acta medica Okayama*, **59**(3), 89–92, 2005
32. Sun QL, Hua S, Ye JH, Zheng XQ, Liang YR, Flavonoids and volatiles in *Chrysanthemum morifolium* Ramat flower from Tongxiang County in China, *African Journal of Biotechnology*, **9**(25), 3817–3821, 2010
33. Tokunaga S, Y Takeda, T Niimoto, N Nishida, T Kubo, T Ohno, Y Matsuura, Y Kawahara, K Shinomiya, C Kamei, Effect of valerian extract preparation (BIM) on the sleep-wake cycle in rats, *Biological & pharmaceutical bulletin*, **30**(2), 363–366, 2007
34. Usman LA, Oladosu IA, Olawore NO, Fakunle CO, Hamid AA, Lawal A, Chemical composition of leaf oil of Nigerian

- grown *Aspilia africana*. C. D. Adams., **3**(4), 899-901, 2009
35. Vellucci SV, The effects of ether stress of betametasone treatment on the concentrations of noradrenaline and dopamine in various regions of the rat brain, *Br J Pharmac*, **60**(4), 601-605, 1977
36. Wu LY, Gao HZ, Wang XL, Ye JH, Lu JL, Liang YR, Analysis of chemical composition of *Chrysanthemum indicum* flowers by GC/MS and HPLC, *Journal of Medicinal Plants Research*, **4**(5), 421-426, 2010
37. Yoon JS, Koo KA, Ma CJ, Sung SH, Kim YC, Neuroprotective ligans from *Biota orientalis* leaves, *Natural Product Sciences*, **14**(3), 167-170, 2008
38. Zhang J, Yang J, Duan J, Liang Z, Zhang L, Huo Y, Zhang Y, Quantitative and qualitative analysis of flavonoids in leaves of *Adinandra nitida* by high performance liquid chromatography with UV and electrospray ionization tandem mass spectrometry detection, *Analytica Chimica Acta*, **532**(1), 97-104, 2005
39. Zhu M, Bowery NG, Greengrass PM, Phillipson JD, Application of radioligand receptor binding assays in the search for CNS active principles from Chinese medicinal plants, *J Ethnopharmacol*, **54**(2-3), 153-164, 1996

김 동 수 이학박사

소 속 : 한국식품연구원 공정기술연구단

전문분야 : 발효공학, 수산화학

E - mail : dskim@kfri.re.kr

T E L : 031-780-9050