(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0058032
(43) 공개일자 2010년06월03일

(51) Int. Cl.
*A61K 36/54* (2006.01) *A61P 25/16* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0116692
(22) 출원일자 2008년11월24일
심사청구일자 2008년11월24일

(71) 출원인
**경희대학교 산학협력단**
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제캠퍼스내
(72) 발명자
**임사비나**
서울시 강남구 삼성2동 롯데캐슬프레미어 104동 803호
**김용식**
서울시 서초구 잠원동 한신13차 327-301
*(뒷면에 계속)*
(74) 대리인
**이원희**

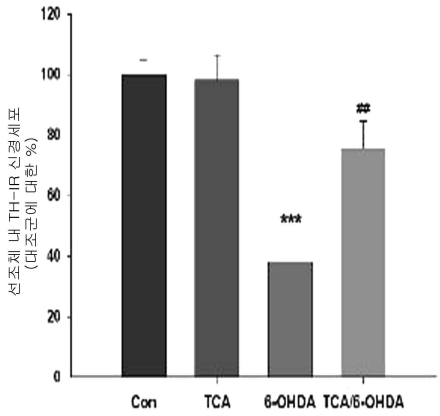
전체 청구항 수 : 총 15 항

# (54) 계피나무 추출물, 이의 분획물 또는 계피나무로부터 분리한트랜스-신남알데하이드를 유효성분으로 함유하는 파킨슨 질환 예방 및 치료용 조성물

## *(57) 요 약*

본 발명은 녹나무과(Lauraceal)의 계피나무(*Cinnamomum cassia*)의 추출물, 이의 분획물 또는 계피나무로부터 분리한 트랜스-신남알데하이드(trans-cinnamaldeyde)를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 물, 알코올 또는 이의 혼합물을 용매로 하여 추출되는 계피나무 가지 또는 껍질의 추출물, 이의 분획물 및 계피나무로부터 분리한 활성 화합물인 트랜스-신남알데하이드는 파킨슨병을 유발할 수 있는 신경독성물질에 의한 도파민 신경세포의 손상을 보호함으로써 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

*대 표 도* - 도1



(72) 발명자

**표지희**

서울시 송파구 문정2동 150 올림픽훼미리아파트 232동 903호

**정미영**

서울시 동대문구 이문3동 쌍용아파트 114동 1301호

## *특허청구의 범위*

### 청구항 1

계피나무(*Cinnamomum cassia*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 계피나무 추출물은 계피나무의 가지 또는 껍질 부위를 사용하여 추출한 것을 특징으로 하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물.

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 계피나무 추출물은 물, $C_1$ 내지 $C_4$ 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 사용하여 추출하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물.

### 청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물.

### 청구항 5

물, $C_1$ 내지 $C_4$ 저급 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출되는 계피나무 추출물에 추가적으로 유기용매를 가하여 추출된 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물.

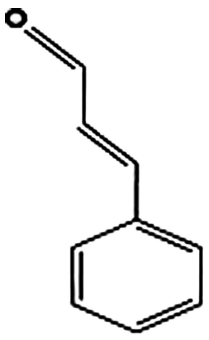
### 청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 유기용매는 에틸아세테이트 또는 부탄올인 것을 특징으로 하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물.

### 청구항 7

하기 화학식 1로 표시되는 트랜스-신남알데하이드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물:

[화학식 1]



.

**청구항 8**

계피나무(*Cinnamomum cassia*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강기능식품.

**청구항 9**

제 8항에 있어서, 상기 계피나무 추출물은 계피나무의 가지 또는 껍질 부위를 사용하여 추출한 것을 특징으로 하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강기능식품.

**청구항 10**

제 8항에 있어서, 상기 계피나무 추출물은 물, 에탄올 또는 이들의 혼합물을 용매로 사용하여 추출하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강기능식품.

**청구항 11**

물, 에탄올 또는 이들의 혼합물을 용매로 사용하여 추출되는 계피나무 추출물에 추가적으로 유기용매를 가하여 추출된 유기용매 분획물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강기능식품.

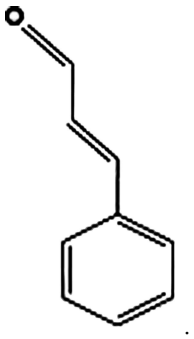
**청구항 12**

제 11항에 있어서, 상기 유기용매는 에틸아세테이트 또는 부탄올인 것을 특징으로 하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강기능식품.

**청구항 13**

하기 화학식 1로 표시되는 트랜스-신남알데하이드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



**청구항 14**

약학적으로 유효한 양의 상기 제 1항, 제 5항, 또는 제 7항의 조성물을 파킨슨병에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 파킨슨병 치료방법.

**청구항 15**

약학적으로 유효한 양의 상기 제 1항, 제 5항, 또는 제 7항의 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 파킨슨병 예방방법.

# 명 세 서

## 발명의 상세한 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 계피나무 추출물, 이의 분획물 또는 계피나무로부터 분리한 신남알데하이드(cinnamaldehyde)를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 물, 알코올 또는 이의 혼합물을 용매로 하여 추출되는 계피나무 가지 또는 껍질 추출물, 이의 분획물 및 계피나무로부터 분리한 활성 화합물인 신남알데하이드를 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 파킨슨병은 중뇌의 흑질 (substantia nigra pars compacta, SNpc)에 존재하는 도파민성 신경세포의 사멸과 선조체 (striatum)의 도파민 감소에 의하여, 근육경직, 진전, 운동실조 등의 증상이 나타나는 퇴행성 신경질환이다.

[0003] 파킨슨병에서의 도파민 신경세포의 선택적인 손상 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않지만, 최근 연구에 의하면 미세아교세포의 활성이 흑질 밀집부의 신경 변성에 관여하는 중요한 기전 중의 하나로 제시되고 있다. 파킨슨병에서의 도파민 신경세포의 선택적인 손상 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지는 않으나, 전자전달계 (electron transport chain)의 Complex I, 즉 니코틴산아미드 아데노신 디뉴클레오타이드 (NADH, Nicotinamide adenosine dinucleotide) - 유비퀴논(ubiquinone) 산화환원 효소의 차단으로 인한 도파민성 신경의 변성, 도파민의 자동 산화 또는 모노아민 산화 효소(MAO, MonoAmine Oxidase)에 의한 대사과정에서의 생성되는 활성산소, 세포 내 칼슘농도의 변화, 내인성 흥분독소(excitotoxin)의 독성, 흑질 부위에 신경교세포, 특히 활성화된 미세아교세포의 이상 발현 등의 병리적 소견을 나타내는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 신경교세포 중 성상세포(astrocyte)는 신경계에 존재하는 세포의 일종으로 전체 뇌 세포의 90%를 차지하며, 신경세포의 기능을 유지하는데 관여하는 것으로 잘 알려져 있으나, 최근에는 성상세포의 새로운 기능이 보고가 되고 있다. 한편, 신경교세포의 하나인 미세아교세포(microglia)는 성상세포와 함께 중추 신경 변성에서 여러 종류의 케모카인(chemokines)과 유도산화질소합성효소(inducible nitric oxide synthase; iNOS), 사이클로옥시지나(cyclooxygenase; COX)-2 등의 유전자 발현이 증가되어 다양한 신경 변성 매개물질을 생성하는 것이 잘 알려져 있으며, 이렇게 증가된 신경 변성 매개물질은 다양한 기전을 통해 직접 또는 이차적으로 신경세포의 세포사멸을 초래하는데 관여할 수 있음이 보고되고 있다.

[0005] 계피나무(*Cinnamomum cassia* PRESL)는 녹나무과에 속하며, 원산지는 중국이고, 스리랑카, 인도차이나 및 한국(제주)에 분포한다. 높이 7 m, 지름 1.3 m 정도로 곧게 자라고 굵은 가지가 많이 갈라지며 잔가지가 있다. 잎은 마주나고 달걀 모양으로 넓으며 잎의 길이는 4 내지 8 cm이며, 나비는 3 내지 7 cm 정도로 끝이 다소 둔하다. 앞면은 녹색, 뒷면은 분백색이고 5 내지 7개의 손바닥 모양의 맥이 있으며 가장자리에는 둔한 톱니가 있다. 계피나무의 꽃은 6월에 피고 연한 노란빛을 띤 녹색이며 새가지 끝 잎겨드랑이에 산형꽃차례로 달린다. 꽃받침은 통 모양이며 윗부분이 6개로 갈라진다. 수술은 3개씩 4줄로 늘어서고 가장 안쪽 줄은 꽃밥이 없다. 암술은 1개이고 열매는 3 내지 5개씩 달리고, 씨는 편평하며 한쪽에 날개가 있다.

[0006] 주요성분으로는 19-아세틸신카시올 A, 안하이드로신젤알라닌, 카시오사이드, 유게놀, 신남알데하이드 및 시남에틸아세테이트가 있으며, 해열 작용, 진통 작용, 건위 작용, 항균 작용, 항바이러스 작용 등에 효과가 있음이 알려져 있다(www.tradimed.co.kr; 지형준 등, 한약(생약)규격집 주해서, 87p, 1998). 그러나 계피나무 추출물 및 트랜스-신남알데하이드가 신경세포를 보호하여 파킨슨병 등의 퇴행성 신경질환 예방 및 치료 효과에 대한 보

고는 전무하다.

[0007] 천연식물에 존재하는 플라보노이드(flavonoid)를 포함한 여러 물질들은 강력한 항산화, 항염증 효과가 있으며, 항암작용을 발휘하는 것이 알려져 있으며, 특히 플라보노이드 화합물이 시험관 내(*in vitro*)와 일부 동물실험에서 많은 연구가 되었으나, 신경계의 손상을 보호할 수 있는 지의 여부, 또는 신경계 기능의 개선에 대한 효과는 밝혀져 있지 않은 실정이다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 신경세포를 보호하는 물질을 개발하던 중, 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 상기 분획물로부터 분리한 트랜스-신남알데하이드가 생체 내외 실험에서 파킨슨병 양상을 유발할 수 있는 대표적인 신경독성물질인 6-하이드록시도파민(6-hydroxydopamine; 6-OHDA)에 의한 도파민 신경세포의 손상을 보호하고, 지질다당류인 LPS(lipopolysaccharide)에 의한 신경세포의 활성을 억제할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명의 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 상기 분획물로부터 분리한 트랜스-신남알데하이드를 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있음을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

## *발명의 내용*

### *해결 하고자하는 과제*

[0009] 본 발명의 목적은 본 발명은 계피나무(*Cinnamomum cassia*) 추출물, 이의 분획물, 또는 계피나무로부터 분리한 트랜스-신남알데하이드(trans-cinnamaldehyde) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물, 또는 파킨슨병 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

### *과제 해결수단*

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 물, 알코올 또는 이의 혼합물을 용매로 하여 추출된 계피나무(*Cinnamomum cassia*) 추출물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 추출물을 에틸아세테이트 및 부탄올 순으로 순차적으로 용매 분획한 각 분획물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 트랜스-신남알데하이드(trans-cinnamaldehyde) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 물, 에탄올 또는 이의 혼합물을 용매로 하여 추출된 계피나무 추출물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

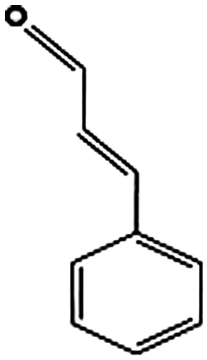
[0014] 또한, 본 발명은 상기 추출물을 에틸아세테이트 및 부탄올 순으로 순차적으로 용매 분획한 각 분획물을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 트랜스-신남알데하이드 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 조성물을 파킨슨병에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 파킨슨병 치료방법을 제공한다.

[0017] 아울러, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 파킨슨병 예방방법을 제공한다.

*화학식 1*

[0018] 

## *효 과*

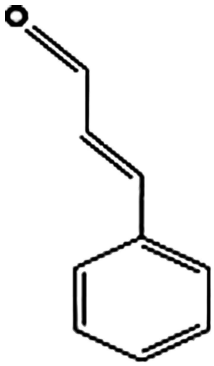
[0019] 본 발명의 계피나무 의 추출물, 이의 분획물 및 상기 분획물로부터 분리한 트랜스-신남알데하이드는 파킨슨병 양상을 유발할 수 있는 신경독성물질에 의한 도파민 신경세포의 손상을 보호하고, 병리적 원인에 의한 신경세포의 이상 활성을 억제할 수 있으므로 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

## *발명의 실시를 위한 구체적인 내용*

[0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명은 계피나무 추출물, 이의 분획물, 또는 하기 화학식 1로 기재되는 트랜스-신남알데하이드(trans cinnamaldeyde) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0022] [화학식 1]

[0023] 

[0024] 상기 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 활성 화합물은

[0025] 1) 계피나무를 물, 알코올 또는 이의 혼합물로 추출하는 단계;

[0026] 2) 단계 1)의 추출물에 추가적으로 유기용매를 가하여 유기용매 분획물을 제조하는 단계; 및

[0027] 3) 단계 2)의 분획물을 컬럼 크로마토그래피하여 활성 화합물을 수득하는 단계를 포함하는 분리정제 방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0028] 상기 방법에 있어서, 단계 1)에서는 계피나무는 재배한 것 또는 시판되는 것에 제한 없이 모두 사용될 수 있다.

[0029] 상기 계피나무는 가지 또는 껍질 부위를 단독으로, 또는 함께 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0030] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 알코올은 $C_1$ 내지 $C_4$ 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하고, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 유기물질은 100% 알코올에서 용출이 더 잘 되고 배당체는 알코올 수용액에서 용출이 더 잘 되므로 필요에 따라 알코올 또는 알코올 수용액으로 선택하여 사용할 수 있다. 추출시 용매를 건조 및 분쇄된 계피나무 분량의 5 내지 15배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 7 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 추출시간은 2시간 내지 10시간인 것이 바람직하고, 3시간 내지 5시간인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 추출 회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출 방법은 열수추출, 환류추출, 진탕추출 또는 Soxhlet 추출 등이 모두 가능하며 특정 방법에 한정되지 않는다.

[0031] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 유기용매는 에틸아세테이트 또는 부탄올을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서는 계피나무 의 에탄올 수용액 추출물을 물에 현탁한 후 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차적으로 용매 분획하여 각 분획물을 농축하였다.

[0032] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 컬럼 크로마토그래피는 실리카겔, 세파덱스, RP-18, 폴리아미드, 도요펄(Toyopearl) 및 XAD 수지로 이루어진 그룹으로부터 선택된 충진제를 이용한 컬럼을 이용한 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 활성화합물을 분리 및 정제할 수 있다. 컬럼 크로마토그래피는 필요에 따라 적절한 충진제를 선택하여 수차례 실시할 수 있으며, 용매로 클로로포름-메탄올, 에틸아세테이트-메탄올 또는 디클로로메탄-메탄올을 이용할 수 있으나 이에 한정하지 않는다.

[0033] 본 발명의 화학식 1의 트랜스-신남알데하이드는 계피나무 추출물로부터 컬럼 크로마토그래피를 사용하여 분리한 것 또는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA) 등에서 구입한 것을 모두 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학적으로 허용가능한 염은 유리산(free acid)에 의해 형성된 부가염이 유용하다. 적합한 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있으며, 무기산으로는 염산, 브롬산, 황산 및 인산 등을 사용할 수 있고 유기산으로는 구연산(citric acid), 초산, 젖산, 주석산(tartariac acid), 말레인산, 푸마르산(fumaric acid), 포름산, 프로피온산(propionic acid), 옥살산, 트리플루오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메탄술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 갈룩투론산, 엠본산, 글루탐산 또는 아스파르트산 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0035] 본 발명에서는 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드가 LPS에 의한 신경세포의 활성을 억제할 수 있는지 알아보기 위해, 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드가 인지질다당류(LPS)에 의해 유발된 마우스 미세아교세포의 세포사멸 증가, NO 생성량 증가, 및 iNOS 및 COX-2 발현량 증가에 미치는 효과를 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드는 NO 생성량 감소, 및 iNOS 및 COX-2 발현량 감소효과를 나타내었다.

[0036] 또한, 본 발명에서는 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드가 생체 내(*in vivo*)에서 신경세포 보호 효과를 나타낼 수 있는지 알아보기 위해, 생쥐를 이용하여 선조체 내 도파민 및 그 대사물질 함량, 뇌의 지질과산화 생성량, 및 선조체 및 흑질 내 TH(tyrosine hydroxylase), iNOS, COX-2 및 NT(Nitro tyrosine)의 발현량을 각각 측정하였다. 그 결과, 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드는 생쥐의 선조체에서 6-OHDA에 의해 유발된 도파민과 그 대사물질인 DOPAC(3-4-dihydroxyphenylacetic acid) 농도의 감소를 억제하였고, 6-OHDA에 의해 유발된 지질과산화물의 감소를 억제하였으며, 선조체 및 흑질에서 6-OHDA에 의해 유발된 TH(tyrosine hydroxylase)의 감소, iNOS의 증가 및 COX-2의 증가를 억제하였다.

[0037] 또한, 본 발명에서는 트랜스 신남 알데하이드가 생체 내(*in vivo*)에서 신경세포 보호 효과를 나타낼 수 있는지를 알아보기 위해, 면역조직화학염색을 통해 흑질의 도파민성 신경세포 형태 및 선조체의 신경섬유 형태를 관찰하였다. 그 결과, 트랜스 신남 알데하이드는 흑질에서 6-OHDA에 의해 유발된 TH(tyrosine hydroxylase) 양성 도파민성 신경세포의 감소를 억제하였고, 선조체에서 6-OHDA에 의해 유발된 TH 양성 도파민 섬유의 손실을 억제하였다(도 1, 도 2 및 도 3 참조).

[0038] 따라서, 본 발명의 계피나무 추출물, 이의 분획물 또는 트랜스 신남 알데하이드는 신경독성물질에 의한 도파민 신경세포의 손상을 보호함으로써 이들을 유효성분으로 하여 파킨슨병 예방 및 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 파킨슨병에 걸린 개체에 투여하는 단계를 포함하는 파킨슨병 치료방법을 제공한다.

[0040] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 파킨슨병 예방방법을 제공한다.

[0041] 상기 방법에 있어서, 조성물은 계피나무 추출물, 이의 분획물 또는 트랜스-신남알데하이드 중에서 하나 이상을 선택적으로 함유할 수 있으며, 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

[0042] 상기 방법에 있어서, 조성물은 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤 및 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사를 통할 수 있다.

[0043] 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 바람직하기로는 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다. 본 발명의 조성물의 유효용량은 0.0001 ~ 10 g/kg이고, 바람직하기로는 0.0001 g ~ 5 g/kg이며, 하루 1 ~ 6회 투여될 수 있다.

[0044] 본 발명의 조성물은 파킨슨병 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0045] 아울러, 본 발명은 계피나무 추출물, 이의 분획물, 또는 화학식 1로 기재되는 트랜스-신남알데하이드(trans-cinnamaldehyde) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 파킨슨병 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0046] 본 발명의 건강기능식품은 계피나무 추출물, 이의 분획물 또는 트랜스-신남알데하이드를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 약학적 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0047] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0048] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0049] 상기 외에 본 발명의 건강기능식품은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음

료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

## *실 시 예*

[0050] 이하, 본 발명을 하기 실시예, 실험예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.

[0051] 단, 하기 실시예, 실험예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기의 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0052] **<실시예 1> 계피나무 추출물의 제조**

[0053] **<1-1> 계피나무 에탄올 수용액 추출물**

[0054] 경동시장에서 구입한 계피나무를 건조시킨 후 분쇄한 다음, 계피나무 시료 200 g을 3ℓ의 플라스크에 넣은 후 1.5 ℓ의 80% 에탄올 수용액을 가하여 3시간 동안 추출하였다. 이 과정을 3회 반복하여 상층액을 모은 후, 거름종이로 여과하고 진공감압하에 농축하여 계피나무 에탄올 수용액 추출물 7 g을 수득하였다.

[0055] **<1-2> 계피나무 물 추출물**

[0056] 상기 실시예 <1-1>에서 80% 에탄올 수용액 대신 증류수를 가한 것을 제외하고 동일하게 하여 계피나무 물 추출물 10.2 g을 수득하였다.

[0057] **<1-3> 계피나무 100% 메탄올 추출물**

[0058] 상기 실시예 <1-1>에서 80% 에탄올 수용액 대신 100% 메탄올을 가한 것을 제외하고 동일하게 하여 계피나무 메탄올 추출물 8 g을 수득하였다.

[0059] **<실시예 2> 계피나무 추출물로부터 분획물의 제조**

[0060] 상기 실시예 <1-1>에서 수득한 계피나무 에탄올 수용액 추출물 5.5 g을 물 1 ℓ에 현탁시킨 후에, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차적으로 용매 분획하였다. 먼저, 물 1ℓ에 현탁시킨 계피나무 에탄올 추출물에 에틸아세테이트 1ℓ를 첨가하여 용해한 다음, 이를 분획여두에서 에틸아세테이트 층에 용해되는 성분만 분리해서 진공건조하였다. 이 과정을 3회 반복 수행하여 에틸아세테이트 분획물을 수득하였다(0.7g). 남은 수층에 부탄올 1ℓ를 첨가하여 분획여두에서 부탄올 층에 용해되는 성분만 분리하여 진공건조하였다. 이 과정을 3회 반복 수행하여 부탄올 분획물을 수득하였다(3.5g).

[0061] **<실시예 3> 트랜스-신남알데하이드(trans-cinnamaldehyde)의 제조**

[0062] 상기 실시예 <1-3>에서 추출한 계피나무 메탄올 추출물을 메틸렌클로라이드에 녹인 후 실리카겔(Merck, Art No. 9385)에 가하여 활성물질을 흡착시킨 다음, 에틸아세테이트와 핵산의 비율을 95 : 5에서 80 : 20으로 변화시키면서 실리카겔 칼럼 크로마토그래피하여 활성분획을 분리하였다. 수득한 분획물을 C18 칼럼에 흡착시킨 다음 메탄올과 물로 용출시켜 부분 정제하여 화학식 1의 트랜스-신남알데하이드를 수득하였다.

[0063] **<실험예 1> 신경세포 보호효과 측정**

[0064] **<1-1> 세포 배양**

[0065] 본 발명자들은 마우스 미세아교 세포주(mouse microglial cell line)인 BV2 세포(Sigma, USA)를 100 U/mL 페니실린 및 100 ug/mL 스트렙토마이신이 들어있는 5% FBS(Gibsco, USA)와 DMEM(Sigma, USA) 배지로 5% $CO_2$, 37℃에서 배양하였다.

[0066] **<1-2> 세포생존율 측정**

[0067] 본 발명자들은 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드가 신경독성물질에 대한 신경세포 보호 효과를 가지는지 알아보기 위해서, MTT 분석법을 이용하여 세포생존률을 측정하였다. 먼저, 상기 실험예 <2-1>에서 배양한 BV2 세포를 96-웰 플레이트에 웰 당 $5\times10^3$개로 깔고 1% FBS가 들어있는 DMEM(낮은 포도당) 배지에서 24시간 동안 전배양(pre-incubation)하였다. 상기 BV2 세포에 3 ~ 10 ug/mL의 계피나무 추출물, 3 ~ 10 ug/mL의 계피나무 추출물의 분획물, 및 1 ~ 3 uM의 트랜스 신남 알데하이드를 각각 처리한 후, 1시간 후 1 ug/ml의 LPS를 처리한 다음, 24시간 후 MTT로 세포생존율을 확인하였다.

[0068] 그 결과, 표 1에서 보는 바와 같이 BV2 세포에 LPS만 처리한 군에 비해 3 ~ 10 ug/mL의 계피나무 추출물 및 이의 분획물, 및 1 ~ 3 uM의 트랜스 신남 알데하이드를 미리 처리한 군의 세포생존율이 약 35 ~ 45% 높았다. 따라서 본 발명의 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드는 LPS로 유발된 BV2 세포사멸에 대한 보호 효과가 있음을 알 수 있었다.

*표 1*

[0069]

| 시료 | 농도 | 세포생존률(대조군에 대한 %) |
|---|---|---|
| 대조군(식염수 처리) | | 100 |
| LPS만 처리 | | 55 |
| 계피나무 에탄올 수용액 추출물 | 3(ug/mL) | 99 |
| | 10(ug/mL) | 95 |
| 계피나무 물 추출물 | 3(ug/mL) | 95 |
| | 10(ug/mL) | 92 |
| 계피나무 메탄올 추출물 | 3(ug/mL) | 94 |
| | 10(ug/mL) | 90 |
| 계피나무 에틸아세테이트 분획물 | 3(ug/mL) | 96 |
| | 10(ug/mL) | 94 |
| 계피나무 부탄올 분획물 | 3(ug/mL) | 93 |
| | 10(ug/mL) | 90 |
| 트랜스-신남알데하이드 | 1(uM) | 97 |
| | 3(uM) | 100 |

[0070] **<1-3> NO 생성량 측정**

[0071] 본 발명자들은 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드가 LPS로 유도된 신경세포에서의 NO 생성을 억제하는지 알아보았다. 먼저, BV2 세포가 부착되어있는 60 디쉬에 1% FBS를 포함하는 DMEM로 배지를 갈아준 후, 3 ~ 10 ug/mL의 계피나무 추출물, 3 ~ 10 ug/mL의 계피나무 분획물, 및 1 ~ 3 uM의 트랜스 신남 알데하이드를 각각 전처리하였다. 1 시간 후에 1 ug/ml LPS를 처리하고 24시간 후, 상층액을 회수하여 그리스 시약(Griess reagent)을 동량 첨가하고 ELISA 리더기로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 일정 농도의 아질산나트륨(sodium nitrite)의 표준 곡선을 이용하여 생성된 NO의 함량을 계산하였다.

[0072] 그 결과, 표 2에서 보는 바와 같이 NO 생성량은 LPS만 처리한 군이 대조군에 비해 약 4.5배 증가한 반면에, 1 ~ 10 ug/mL의 계피나무 추출물 및 이의 분획물, 및 1 ~ 3 uM의 트랜스 신남 알데하이드를 미리 처리한 군이 농도 의존적으로 감소하였다. 따라서 본 발명의 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드는 LPS로 유도된 BV2 세포에서의 NO 생성에 대한 억제 효과가 있음을 알 수 있었다.

*표 2*

[0073]

| 시료 | 농도 | NO 생성량(대조군에 대한 %) |
|---|---|---|
| 대조군(식염수 처리) | | 100 |
| LPS만 처리 | | 450 |
| 계피나무 에탄올 수용액 추출물 | 1(ug/mL) | 300 |
| | 3(ug/mL) | 290 |
| | 10(ug/mL) | 150 |
| 계피나무 물 추출물 | 1(ug/mL) | 290 |
| | 3(ug/mL) | 285 |
| | 10(ug/mL) | 155 |
| 계피나무 메탄올 추출물 | 1(ug/mL) | 295 |
| | 3(ug/mL) | 280 |
| | 10(ug/mL) | 160 |
| 계피나무 에틸아세테이트 분획물 | 1(ug/mL) | 320 |
| | 3(ug/mL) | 305 |
| | 10(ug/mL) | 225 |
| 계피나무 부탄올 분획물 | 1(ug/mL) | 310 |
| | 3(ug/mL) | 295 |
| | 10(ug/mL) | 165 |
| 트랜스-신남알데하이드 | 1(uM) | 370 |
| | 3(uM) | 350 |

[0074] **<1-4> 웨스턴 블랏팅(Western blotting)**

[0075] 본 발명자들은 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드가 LPS로 유도된 신경세포에서의 iNOS 및 COX-2 발현 증가를 억제하는지 알아보았다. 먼저, BV2 세포를 LPS로 처리한 후, 24시간 뒤 용해 완충용액(lysis buffer)을 이용하여 단백질을 분리하였다. 단백질 샘플을 단백질 분석 키트(protein assay kit)를 이용하여 정량한 후, SDS-PAGE를 시행한 다음, 전기영동이 끝난 겔(gel)은 니트로셀룰로오스막(nitrocellulose membrane)으로 이동시켰다. 단백질이 이동된 니트로셀룰로오스막은 항토끼 COX-2 항체(anti-rabbit COX-2 antibody)와 항마우스 iNOS(anti-mouse iNOS)를 1:1000로 희석하여 4℃에서 밤새 반응시켰다. TBST(Tris base solution, 0.1% triton X-100)로 10분간 3회 세척한 후, 2차 항체를 1:2000으로 희석하여 1시간 반응시키고, TBST로 10분씩 3번 세척한 뒤 ECL 키트로 반응하여 X-레이 필름(ray film)에 노출시켰다.

[0076] 그 결과, LPS로 유도된 BV2 세포는 대조군에 비해 iNOS 및 COX-2의 발현이 유의성 있게 증가하였으나, 3 ~ 10 ug/mL의 계피나무 추출물 및 이의 분획물, 및 1 ~ 3 uM의 트랜스 신남 알데하이드를 미리 처리한 군의 경우 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다. 따라서 본 발명의 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드는 LPS로 유도된 BV2 세포에서의 iNOS 및 COX-2 발현 증가를 억제시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0077] **<실험예 2> 생체 내 도파민 신경세포 손상보호 효과 측정**

[0078] **<2-1> 동물의 사육 및 시료투여**

[0079] 본 발명자들은 6주령의 생쥐(ICR mouse)(Sigma, USA)를 구입하여 사육하였다. 사육조건은 국제보건기구(National Institute of Health; NIH) 및 대한의학과학회(The Korean Academy of Medical Sciences)의 동물사육지침을 따랐다. 생쥐에 노르에피네프린(norepineprine)의 재흡수를 막기 위하여 6-OHDA 투여 30분 전에 데시프라민(desipramine)(25 mg/kg)을 복강으로 주사하였다. 6-OHDA는 0.02% 아스코르빈산(ascorbic acid)에 녹이고 1 N NaOH를 이용하여 pH를 7.4로 맞춘 후, 6-OHDA 60 ug(10 ug/ul, Sigma, USA)을 생쥐의 뇌실에 주입하였다. 대조군은 6-OHDA 대신 pH 7.4의 식염수를 동일하게 주입하였다. 계피나무 추출물(50 및 100 mg/kg), 이의 분획물(50 mg/kg) 및 트랜스-신남알데하이드(30 mg/kg)를 복강으로 6-OHDA 주입 1시간 전, 주입 3시간, 7시간, 24시간 및 48시간 후로 총 5번 투여하였다. 대조군은 추출물 대신 0.5% DMSO를 동량 주입하였다.

[0080] **<2-2> 선조체 내 도파민 및 그 대사물질의 함량 측정**

[0081] 본 발명자들은 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드가 신경독성물질에 대한 신경세포 보호 효과를 가지는지 알아보기 위해서, 6-OHDA 투여에 따른 선조체 내에서의 도파민과 그 대사물질인 DOPAC(3-4-dihydroxyphenylacetic acid) 농도를 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)로 측정하였다. 병변 제작 7일 후, 생쥐를 경추 탈골하여 희생시킨 다음, 즉시 뇌 조직을 적출하였다. 냉각된 유리판 위에 대뇌 정중선을 따라 좌우 대뇌반구를 분리한 후, 뇌량을 경계로 하여 시상 및 대뇌피질로부터 선조체만을 분리 및 절취한 후, 이를 급속 동결시켜 측정시까지 -70℃에서 보관하였다. 동결된 검체에 냉각된 0.5 ml의 0.1 M 퍼클로릭산(percloric acid), 0.1 mM EDTA 용액을 첨가한 후, 초음파 마쇄기로 30초씩 3번 30-S 포즈(pause) 조건에서 조직 균등액을 제조한 다음, 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 그 상층액을 분리하였다. 상기 상층액을 니트로셀룰로스 막 여과지(nitrocellulose membrane filter; 0.2 um, Millipore)로 여과한 후, 10 ul를 HPLC 시스템에 주입하였다. HPLC의 분리조건은 Shisheido uBondapak™ C18 4.6 x150 mm 컬럼(particle size 10 um)을 사용하였고, 전기화학 검출기(electrochemical detector)(ICA-5000, TOA)는 700 mV의 Ag/Agcl 전극을 사용하며, 이동상(mobile phase)은 0.07 M 일염기 인산나트륨(monobasic sodium phosphate), 1 mM 옥탄설폰산 나트륨(sodium octansulfonic acid), 0.1 uM EDTA, 5% 아세토니트릴(acetonitrile)(pH 3.2) 용액으로 0.7 ml/min 유속으로 유지하였다. 도파민 및 DOPAC의 농도는 측정에 필요한 각 물질의 농도측정을 위해 조직 균등액 제조시 일정량의 디히드록시벤질아민(dihydroxybenzylamine; DHBA)을 내위 표준(internal standard)으로 조직균등액에 첨가하여 보관하였고, 원심분리 후 생성된 침전물은 0.4 ml PBS에 부유하여 단백 측정에 사용하였다.

[0082] 그 결과, 표 3에서 보는 바와 같이 선조체 내 도파민 및 DOPAC의 농도는 6-OHDA만을 주입한 경우 대조군(0.02% L-아스코르빈산을 포함한 식염수 주입)에 비해 감소(대조군에 비해, 도파민: 63%, DOPAC: 45%)하였으나, 계피나무 추출물(50 및 100 mg/kg), 이의 분획물(50 mg/kg) 및 트랜스-신남알데하이드(30 mg/kg)를 미리 주입한 경우 상기 6-OHDA만을 주입한 경우에 비해 약 20 ~ 30% 증가하였다. 따라서 본 발명의 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드는 선조체 내에서 6-OHDA에 의해 유발된 도파민 및 DOPAC 농도의 감소를 억제함을 알 수 있었다.

*표 3*

[0083]

| 시료 | 농도 (mg/kg) | 도파민 농도 (대조군에 대한 %) | DOPAC 농도 (대조군에 대한 %) |
|---|---|---|---|
| 대조군(식염수 처리) | | 100 | 100 |
| 6-OHDA만 처리 | | 63 | 45 |
| 계피나무 에탄올 수용액 추출물 | 50 | 83 | 67 |
| | 100 | 84 | 68 |
| 계피나무 물 추출물 | 50 | 83 | 65 |
| | 100 | 83 | 66 |
| 계피나무 메탄올 추출물 | 50 | 84 | 67 |
| | 100 | 85 | 68 |
| 계피나무 에틸아세테이트 분획물 | 50 | 86 | 70 |
| 계피나무 부탄올 분획물 | 50 | 85 | 69 |
| 트랜스-신남알데하이드 | 30 | 86 | 70 |

[0084] **<2-3> 지질과산화(lipid peroxidation) 생성량 측정**

[0085] 본 발명자들은 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드가 지질과산화물질인 말론디알데하이드(malondialdehyde; MDA)의 감소 억제효과를 가지는지 알아보기 위해, 생쥐 뇌 호모제네이트(brain homogenate)(2 ㎎/㎖)와 시료를 혼합한 후, 37℃에서 1시간 동안 진탕 수욕조에서 반응시켰다. 상기 반응물을 8.1% SDS, 20% 아세트산(pH 2.5), 0.8% TBA(0.01% BHT 첨가)를 넣고, 95℃에서 1시간 동안 끓인 후 식혀 5분 동안 3000 rpm으로 원심분리한 다음, 흡광도를 분광 광도계(UVIKON 933)를 이용하여 532 nm에서 측정하였다.

[0086] 그 결과, 표 4에서 보는 바와 같이 MDA의 농도는 6-OHDA만을 주입한 경우 대조군에 비해 약 50% 감소하였으나, 계피나무 추출물(50 및 100 mg/kg), 이의 분획물(50 mg/kg) 및 트랜스-신남알데하이드(30 mg/kg)를 미리 주입한

경우 상기 6-OHDA만을 주입한 경우에 비해 약 30 ~ 40% 증가하였다. 따라서 본 발명의 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드는 6-OHDA에 의해 유발된 지질과산화물의 감소를 억제함을 알 수 있었다.

*표 4*

[0087]

| 시료 | 농도 (mg/kg) | MDA 농도(대조군에 대한 %) |
|---|---|---|
| 대조군(식염수 처리) | | 100 |
| 6-OHDA만 처리 | | 50 |
| 계피나무 에탄올 수용액 추출물 | 50 | 85 |
| | 100 | 86 |
| 계피나무 물 추출물 | 50 | 80 |
| | 100 | 82 |
| 계피나무 메탄올 추출물 | 50 | 82 |
| | 100 | 84 |
| 계피나무 에틸아세테이트 분획물 | 50 | 88 |
| 계피나무 부탄올 분획물 | 50 | 85 |
| 트랜스-신남알데하이드 | 30 | 90 |

[0088] **<2-4> 웨스턴 블랏팅(Western blotting)**

[0089] 본 발명자들은 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드가 6-OHDA로 유도된 선조체 및 흑질(substantia nigra)에서의 TH(tyrosine hydroxylase), iNOS, COX-2 및 NT(Nitro tyrosine) 발현 변화에 미치는 영향을 알아보았다. 먼저, 병변 제작 7일 후 지질과산화물을 측정할 때와 마찬가지의 방법으로 조직 균등액을 제조한 후, 4℃에서 5분간 13000 rpm으로 침전시킨 다음, 상층액을 취하여 브래드포드(bradford) 방법에 의하여 단백을 정량하고, 10 ug을 웨스턴 블랏하였다. 단백을 10% SDS PAGE 겔을 이용하여 니트로셀룰로오스(Bio-Rad Labolatories., CA, USA)에 이동시킨 후, 단클론 마우스 항 티로신 하이드록시라제(monoclonal mouse anti tyrosine hydroxylase)(Chemicon International, Temecula , USA; 1:3000), 단클론 마우스 항 iNOS(monoclonal mouse anti iNOS)(BD Biosciences Pharmingen, USA; 1:5000), 다클론 마우스 항 Cox-2(monoclonal mouse anti Cox-2)(Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA; 1:1000) 및 단클론 마우스 항 니트로티로신(monoclonal mouse anti Nitro tyrosine)(Upstate, USA; 1:1000)을 이용하여 확인하였다. 반응이 끝난 후에는 HRP가 결합된 이차항체(항 마우스 IgG; 1:2000)를 1시간 동안 반응시킨 후, ECL을 이용하여 확인하였다.

[0090] 그 결과, 표 5에서 보는 바와 같이 6-OHDA로 유도된 선조체 및 흑질에서 TH 및 NT의 발현이 대조군에 비해 유의성 있게 감소[대조군에 비해, TH(선조체: 약 25%, 흑질: 약 38%), NT(선조체: 약 28%, 흑질: 약 40%)]하였으나, 계피나무 추출물(50 및 100 mg/kg), 이의 분획물(50 mg/kg) 및 트랜스-신남알데하이드(30 mg/kg)를 미리 주입한 경우 상기 6-OHDA만을 주입한 경우에 비해 유의성 있게 증가하였다(대조군에 비해, 선조체: 약 65 ~ 75%, 흑질: 약 140 ~ 150%). 따라서 본 발명의 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드는 6-OHDA에 의해 유발된 TH 및 NT의 발현의 감소를 억제시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0091] 또한, 표 6에서 보는 바와 같이 6-OHDA로 유도된 선조체 및 흑질에서 iNOS 및 COX-2의 발현이 대조군에 비해 유의성 있게 증가[대조군에 비해, iNOS(선조체: 약 650%, 흑질: 약 1100%), COX-2(선조체: 약 290%, 흑질: 약 160%)]하였으나, 계피나무 추출물(50 및 100 mg/kg), 이의 분획물(50 mg/kg) 및 트랜스-신남알데하이드(30 mg/kg)를 미리 주입한 경우 상기 6-OHDA만을 주입한 경우에 비해 유의성 있게 감소하였다[대조군에 비해, iNOS(선조체: 약 120 ~ 130%, 흑질: 약 170 ~ 180%), COX-2(선조체: 약 110 ~ 120%, 흑질: 약 110 ~ 120%)]. 따라서 본 발명의 계피나무 추출물, 이의 분획물 및 트랜스 신남 알데하이드는 6-OHDA에 의해 유발된 iNOS 및 COX-2 발현의 증가를 감소시킬 수 있음을 알 수 있었다.

*표 5*

[0092]

| 시료 | 농도 (mg/kg) | TH 농도(대조군에 대한 %) | | NT(대조군에 대한 %) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 선조체 | 흑질 | 선조체 | 흑질 |
| 대조군(식염수 처리) | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 6-OHDA만 처리 | | 25 | 38 | 28 | 40 |
| 계피나무 에탄올 수용액 추출물 | 50 | 70 | 142 | 68 | 140 |
| | 100 | 72 | 145 | 70 | 144 |
| 계피나무 물 추출물 | 50 | 65 | 140 | 65 | 140 |
| | 100 | 68 | 143 | 67 | 142 |
| 계피나무 메탄올 추출물 | 50 | 67 | 142 | 65 | 141 |
| | 100 | 70 | 144 | 68 | 143 |
| 계지 에틸아세테이트 분획물 | 50 | 73 | 147 | 72 | 148 |
| 계지 부탄올 분획물 | 50 | 72 | 145 | 70 | 144 |
| 트랜스-신남알데하이드 | 30 | 73 | 147 | 75 | 150 |

[0093]

*표 6*

[0094]

| 시료 | 농도 (mg/kg) | iNOS 농도(대조군에 대한 %) | | COX-2(대조군에 대한 %) | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 선조체 | 흑질 | 선조체 | 흑질 |
| 대조군(식염수 처리) | | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 6-OHDA만 처리 | | 650 | 1100 | 290 | 160 |
| 계피나무 에탄올 수용액 추출물 | 50 | 118 | 177 | 116 | 118 |
| | 100 | 115 | 173 | 114 | 115 |
| 계피나무 물 추출물 | 50 | 120 | 180 | 120 | 119 |
| | 100 | 118 | 177 | 117 | 115 |
| 계피나무 메탄올 추출물 | 50 | 114 | 178 | 115 | 114 |
| | 100 | 112 | 175 | 114 | 112 |
| 계피나무 에틸아세테이트 분획물 | 50 | 112 | 172 | 112 | 113 |
| 계피나무 부탄올 분획물 | 50 | 114 | 174 | 115 | 114 |
| 트랜스-신남알데하이드 | 30 | 110 | 170 | 110 | 110 |

[0095]

[0096] **<2-5> 면역조직화학염색 및 형태학적 계측**

[0097] 본 발명자들은 트랜스 신남 알데하이드의 신경세포 보호 여부를 알아보기 위해 6-OHDA로 유발한 파킨슨병 모델을 이용하였다. 병변 제작 7일 후, 동물을 마취하여 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 포함한 0.05 M PBS(phosphate-buffered saline)로 관류고정한 후 뇌를 적출하였다. 뇌 조직은 동일 고정액에 다시 처리한 후, 선조체와 흑질을 포함하는 40㎛ 두께의 절편으로 만들어 면역조직화학염색에 사용하였다. 조직절편을 항체에 반응시키기 전에 내재성 peroxidase를 제거하기 위하여 3% $H_2O_2$를 첨가한 0.05 M PBS에 반응시키고, 0.3% Triton X-100을 포함하는 PBS와 3% bovine serum albumin (BSA)을 포함한 0.1 M PBS에 반응시킨 후, 일차항체를 실온에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 일차항체는 항 티로신 하이드록시라제(anti-tyrosine hydroxylase)(TH, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa. Cruz, CA, USA)를 사용하였고, 이차항체를 위해 Vectastain elite ABC kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하였다. 면역반응이 끝난 조직은 0.5mg/ml의 DAB(3,3-diaminobezidine tetrahydrochloride) 용액(40 mg DAB, 0.045% $H_2O_2$ in 100 ml PBS)에서 발색시켜 관찰하였다. TH 면역반응 양성 신경세포의 수를 계측하기 위하여 흑질의 동일 레벨을 나타내는 절편을 선택하여, 100배 배율에서 광학 현미경 (Olympus, Japan)으로 관찰하였다. 선조체의 TH 면역양성 축삭종말의 상대적인 밀도는 일정한 현미경 조명으로 40배 배율에서 CCD 카메라 (software: Optimas, version 6.5, Media cybernetics, MD)를 이용하여 관찰하였다. 계측시에는 실험 내용을 모르게 하고 독립적으로 관찰하였다.

[0098] 그 결과, 표 7에서 보는 바와 같이, 대조군과 각 실험군 사이에는 유의한 차이를 확인할 수 있었다. 6-OHDA 처리군에서 흑질의 TH 양성 도파민성 신경세포의 수는 대조군에 비하여 뚜렷하게 감소하여 대조군의 약 38% 수준이었다. 신남 알데하이드를 주사한 실험대조군은 생리식염수만으로 처리한 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 신남 알데하이드 자체는 도파민성 세포의 형질 발현에 유의한 영향을 미치지 않음을 의미한다. 6-OHDA를 처리한 군에서 흑질의 도파민성 신경세포의 수가 뚜렷하게 감소하였는데 반해, 신남 알데하이드와 6-OHDA를 함께 처리한 실험군에서는 도파민성 신경세포수의 감소 정도가 유의하게 적게 나타나는 것을 관찰하였다. 즉, 신남 알데하이드가 도파민성 신경 세포 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

*표 7*

[0099]

| 군 | 흑질의 TH-IR 세포 수<br>평균±표준편차 |
|---|---|
| 대조군 | 100.00±4.53 |
| 신남 알데하이드 | 98.09±8.35 |
| 6-OHDA | 38.11±11.01*** |
| 신남 알데하이드/6-OHDA | 75.38±9.06## |

[0100] ***$p < 0.001$ (대조군에 비해); ##$p < 0.01$ 6-OHDA (처리군에 비해).

[0101] 하기에 본 발명의 조성물을 위한 제조예를 예시한다.

[0102] **<제조예 1> : 약학적 제제의 제조**

[0103] 1. 산제의 제조

[0104] 실시예 <1-1>의 추출물 2 g

[0105] 유당 1 g

[0106] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0107] 2. 정제의 제조

[0108] 실시예 <1-1>의 추출물 100 mg

[0109] 옥수수전분 100 mg

[0110] 유 당 100 mg

[0111] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0112] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0113] 3. 캡슐제의 제조

[0114] 실시예 <1-2>의 추출물 100 mg

[0115] 옥수수전분 100 mg

[0116] 유 당 100 mg

[0117] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0118] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0119] 4. 환의 제조

[0120] 실시예 <1-2>의 추출물 1 g

[0121] 유당 1.5 g

[0122] 글리세린 1 g

[0123] 자일리톨 0.5 g

[0124] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.

[0125] 5. 과립의 제조

[0126] 실시예 <1-3>의 추출물 150 ㎎

[0127] 대두추출물 50 ㎎

[0128] 포도당 200 ㎎

[0129] 전분 600 ㎎

[0130] 상기의 성분을 혼합한 후, 30 % 에탄올 100 ㎎을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충진하였다.

[0131] **<제제예 2> : 식품의 제조**

[0132] 1. 조리용 양념의 제조

[0133] 본 발명의 <실시예 2>의 에틸아세테이트 분획물 20 ~ 95 중량부로 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0134] 2. 밀가루 식품의 제조

[0135] 본 발명의 <실시예 2>의 에틸아세테이트 분획물 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0136] 3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조

[0137] 본 발명의 실시예 <1-1>의 추출물 0.1 ~ 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0138] 4. 그라운드 비프(ground beef)의 제조

[0139] 본 발명의 실시예 <1-1>의 추출물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0140] 5. 유제품(dairy products)의 제조

[0141] 본 발명의 실시예 <1-2>의 추출물 5 ~ 10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0142] 6. 선식의 제조

[0143] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0144] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0145] 본 발명의 실시예 <1-2>의 추출물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0146] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 계지 추출물의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0147] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0148] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0149] 실시예 <1-2> 추출물의 건조분말(3 중량부),

[0150] 영지(0.5 중량부),

[0151] 지황(0.5 중량부)

[0152] **<제제예 3> : 음료의 제조**

[0153] 1. 건강음료의 제조

| | |
|---|---|
| [0154] 실시예 <1-2>의 추출물 | 1000 ㎎ |
| [0155] 구연산 | 1000 ㎎ |
| [0156] 올리고당 | 100 g |
| [0157] 매실농축액 | 2 g |
| [0158] 타우린 | 1 g |
| [0159] 정제수를 가하여 전체 | 900 ㎖ |

[0160] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 ℓ용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

[0161] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0162] 2. 야채쥬스의 제조

[0163] 본 발명의 실시예 <1-2>의 추출물 5 g을 토마토 또는 당근 쥬스 1,000 ㎖에 가하여 건강 증진용 야채쥬스를 제조하였다.

[0164] 3. 과일쥬스의 제조

[0165] 본 발명의 실시예 <1-2>의 추출물 1 g을 사과 또는 포도 쥬스 1,000㎖ 에 가하여 건강 증진용 과일쥬스를 제조하였다.

## *도면의 간단한 설명*

[0166] 도 1은 6-OHDA 투여(30 mg/kg, i.p.) 후, 흑질에서 TH 양성 도파민성 신경세포(TH-ir neuron)의 생존율에 대한 트랜스-신남알데하이드의 효과를 나타내는 그래프이다:

[0167] $^{***}p < 0.001$ (대조군에 비해); $^{\#\#}p < 0.01$ 6-OHDA (처리군에 비해).

[0168] 도 2는 6-OHDA에 의해 유발된 흑질에서 TH 양성 도파민성 신경세포(TH-ir neuron) 죽음에 대한 트랜스-신남알데하이드의 효과를 알아보기 위해, 면역조직화학염색을 이용하여 도파민성 신경세포를 형태학적으로 관찰한 결과를 나타내는 그림이다:

[0169] A: 식염수(30 mg/kg, i.p.)를 투여;

[0170] B: 트랜스-신남알데하이드를 투여(30 mg/kg, i.p.);

[0171] C: 6-OHDA를 투여(60 ug); 및

[0172] D: 6-OHDA 및 트랜스-신남알데하이드를 함께 투여.

[0173] 도 3은 6-OHDA에 의해 유발된 선조체의 TH 양성 도파민 섬유(dopaminergic fiber) 손실에 대한 트랜스-신남알데하이드의 효과를 알아보기 위해, 면역조직화학염색을 이용하여 도파민 섬유를 형태학적으로 관찰한 결과를 나타내는 그림이다:

[0174] A: A: 식염수(30 mg/kg, i.p.)를 투여;

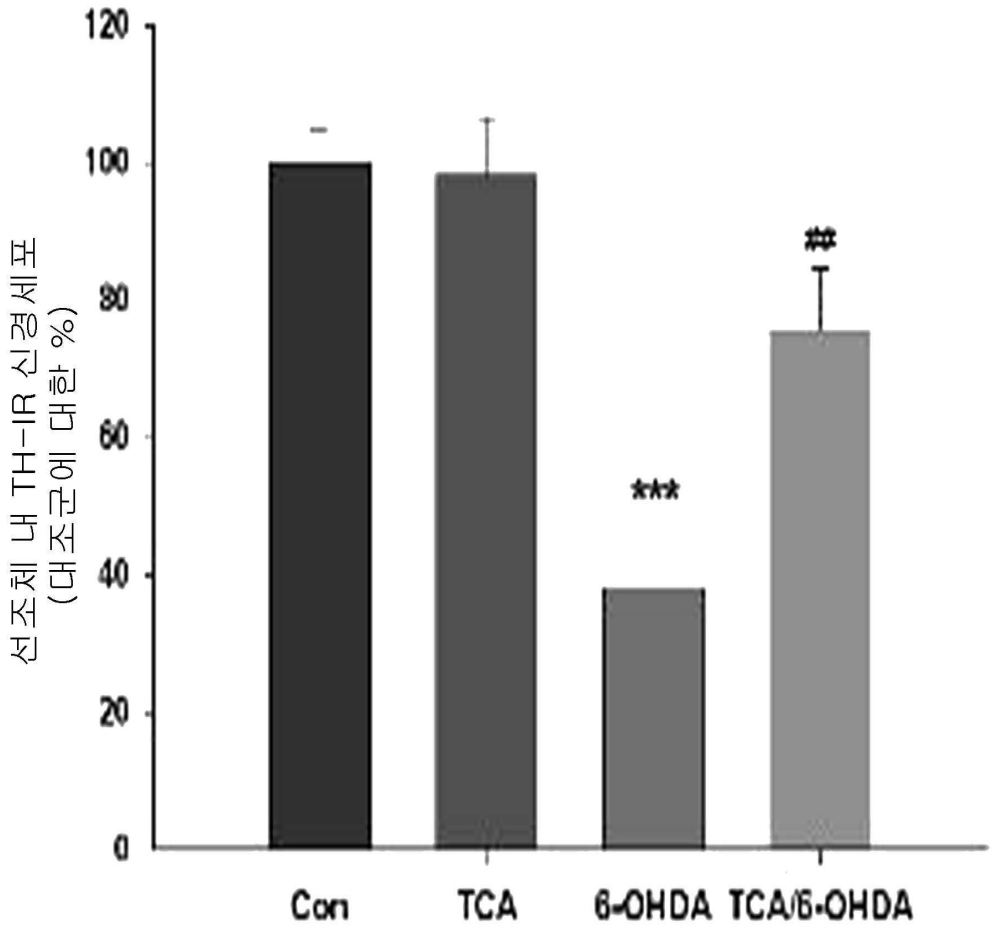
[0175] B: 트랜스-신남알데하이드를 투여(30 mg/kg, i.p.);

[0176] C: 6-OHDA를 투여(60 ug); 및

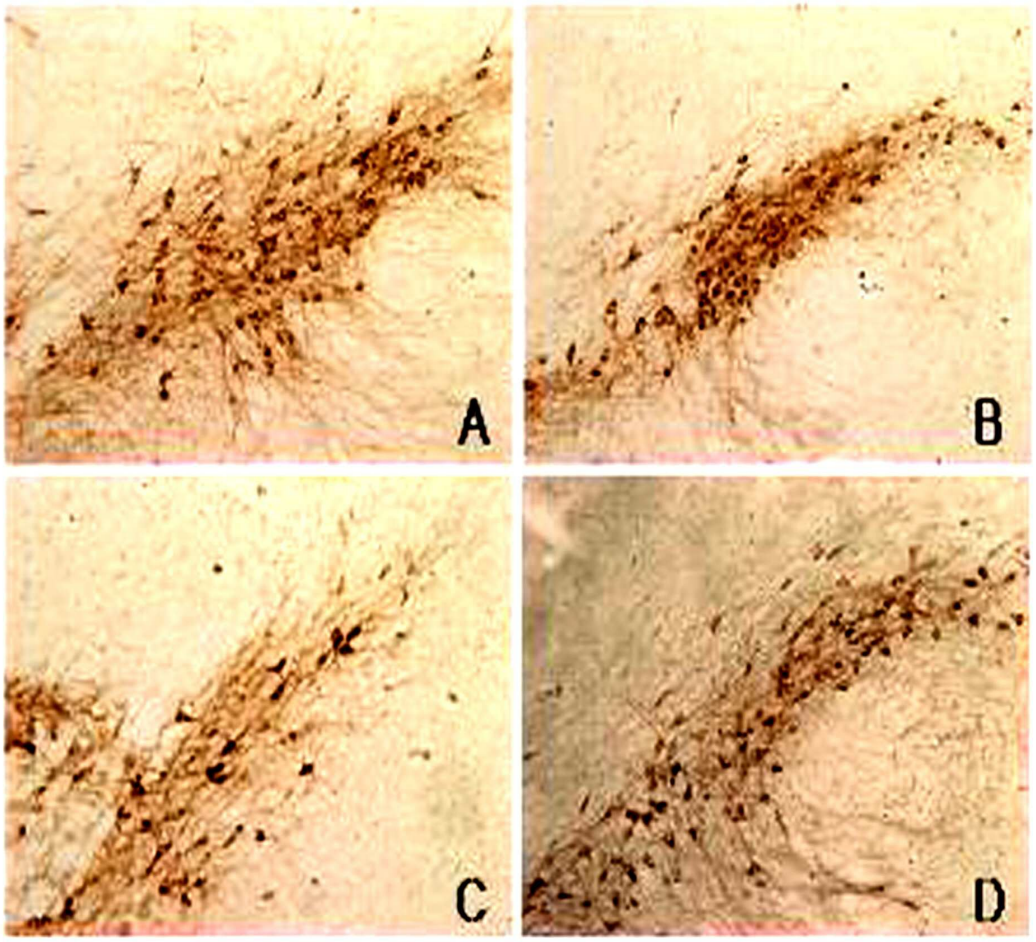
[0177] D: 6-OHDA 및 트랜스-신남알데하이드를 함께 투여.

## 도면

### 도면1



도면2



도면3

